

- 8 NOV 2002

05NOV02 8 16114-1 D00790

NEWPORT

P5/7700 0.00-1144623

The Patent Office

**Filing a translation in connection with
a European patent or a European
patent application**

(See the notes on the back of this form)

Cardiff Road
Newport
Gwent NP9 1RH

1. Your reference

PA 4596 EP.GB

2. European patent number or publication
number of application (or International
publication number (see note (e)))

1144623

3. Full name and address of the or of each
applicant for or proprietor of the
European patent (UK)

Ribopharma AG
95440 Bayreuth
Germany

Patents ADP number (if you know it)

4. What kind of translated document listed at
note (c) are you sending with this form?

1(i)

(Answer by writing 1(i), 1(ii), 1(iii) or 2)



5. Date when the European patent (UK) was
granted or amended
(See note (f))

28.8.02

2002/35

6. Full name, address and postcode in the United
Kingdom to which all correspondence relating
to this form and translation should be sent

SOMMERVILLE & RUSHTON
45 Grosvenor Road
ST ALBANS
Herts
AL1 3AW

Patents ADP number (if you know it)

1511001

7. Do you want the address in part 6 above to
be the address for service recorded on the
Register or to replace the address for service
currently on the Register?
(If so then write 'YES')

Yes

8.

Signature

Date

Sommerville & Rushton

SOMMERVILLE & RUSHTON

7.11.02

9. Name and daytime telephone number of
person to contact in the United Kingdom

P Iddiols
01727 854215

European Patent Application No. 00 910510.7

European Patent Publication No. 1 144 623

I, ELIZABETH ANNE LAMB, of 20 Netherfield Road, Harpenden, Hertfordshire, AL5 2AG, hereby certify that I am conversant with the German language and that the following is a true and correct translation made by me into the English language of the description and drawings of the above European Patent Application to the best of my knowledge and belief.

Elizabeth Lamb, the 13th day of NOVEMBER 2002.

The invention relates to methods in accordance with the precharacterising clause of Claim 1. It furthermore relates to a drug according to the precharacterising clause of Claim 32, an active ingredient according to the precharacterising clause of Claim 63 and also uses according to the precharacterising clauses of Claims 81 and 114.

10 Such a method is known from the subsequently published WO 99/32619. The known method aims at inhibiting the expression of genes in cells of invertebrates. To this end, it is necessary for the double-stranded oligoribonucleotide to have a sequence which is identical
15 with the target gene and which has a length of at least 25 bases. To achieve efficient inhibition, a length of the identical sequence of 300 to 1,000 base pairs is necessary. The manufacturing expenditure for such an oligoribonucleotide is high.

20 DE 196 31 919 C2 describes an antisense RNA with specific secondary structures, with the antisense RNA being present in the form of a vector encoding it. The antisense RNA is an RNA molecule which is complementary
25 to regions of the mRNA. An inhibition of the gene expression is caused by binding to these regions. This inhibition can be used in particular for the diagnosis and/or therapy of diseases, e.g. tumour diseases or viral infections. - The disadvantage is that the antisense
30 RNA has to be introduced into the cell in an amount which is at least as large as the amount of the mRNA. The efficacy of the known antisense methods is not particularly high.

A drug which contains mismatched double-stranded RNA (dsRNA) and biologically active mismatched fragments of dsRNA in the form of a ternary complex with a surfactant is known from US 5,712,257. The dsRNA used in this case consists of synthetically produced single strands of nucleic acid with no defined base sequence. The single strands enter into irregular base pairing with each other, known as "non Watson-Crick", so that mismatched double strands are formed. The known dsRNA serves to inhibit the reproduction of retroviruses, such as HIV. The reproduction of the virus can be inhibited if non-sequence-specific dsRNA is introduced into the cells. In this case an induction of interferon occurs, by which the multiplication of the virus is intended to be inhibited. The inhibiting effect or the effectiveness of this method is poor.

It is known from Fire, A. et al., NATURE, Vol. 391, pp. 806 that dsRNA in which segments of one strand are complementary to a nematode gene to be inhibited inhibits the expression of this gene with a high degree of efficiency. The opinion is expressed that the particular effectiveness of the dsRNA used in nematode cells is not based on the antisense principle, but can possibly be attributed to catalytic properties of the dsRNA or enzymes induced by it. - Nothing is mentioned in this paper about the effectiveness of specific dsRNA with respect to the inhibition of the gene expression, in particular in mammalian cells and human cells.

WO 92/19732 relates to anti-sense oligonucleotides and their use. The single-stranded oligonucleotides are folded back or topologically closed for protection

against enzymatic degeneration by exonucleases. Their action is based in particular on blocking the expression of target genes by triple-helix bonding.

5 WO 98/05770 relates to an antisense RNA. The antisense RNA has a double-stranded region. However, this region is not complementary to the target gene. The double-stranded area is a self-complementary folding produced by a poly-GCGC ... sequence, which serves to stabilise the
10 molecule.

Ulmann et al., 2377 Chemical Review, 90 (1990) June, No. 4, Washington DC, USA gives an overview of the mode of action of antisense oligonucleotides.

15 The object of the present invention is to remove the disadvantages of the prior art. In particular, it is intended to provide as effective as possible a method, drug or active ingredient and the most efficient possible
20 use for the manufacture of a drug or active ingredient with which a particularly effective inhibition of the expression of a given target gene can be effected.

This object is achieved by the features of Claims 1, 32,
25 63, 81 and 114. Advantageous embodiments become apparent from Claims 2 to 31, 33 to 62, 882 to 113 and 115 to 125.

The object is achieved, amongst other things, by the features of Claim 1.

30 It has surprisingly been shown that, even when the complementary region has a length of less than 25 successive nucleotide pairs, an effective inhibition of

the expression of the target gene can be achieved. It is possible to make available corresponding oligoribonucleotides with less manufacturing effort.

- 5 In particular, dsRNA with a length of more than 50 nucleotide pairs induces certain cellular mechanisms, e.g. the dsRNA-dependent protein kinase or the 2-5A system, in mammalian and human cells. This results in the disappearance of the interference effect mediated by
10 the dsRNA which exhibits a defined sequence. As a result, protein biosynthesis in the cell is blocked. The present invention overcomes this disadvantage in particular.
- 15 Furthermore, the uptake of dsRNA with short chain lengths into the cell or into the nucleus is markedly facilitated when compared with longer-chain dsRNAs.

20 It has proved advantageous for the dsRNA to be present in micellar structures, preferably in liposomes. The dsRNA can likewise be enclosed in natural viral capsids or in chemically or enzymatically produced artificial capsids or structures derived therefrom. - The above-mentioned features make it possible to introduce the dsRNA into
25 given target cells.

The gene to be inhibited is expediently expressed in eukaryotic cells. The target gene may be selected from the following group: oncogene, cytokine gene, Id protein
30 gene, development gene, prion gene. It can also be expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia. It can be part of a preferably human-pathogenic virus or viroid. - The proposed method makes

it possible to produce drugs for the therapy of genetically controlled diseases, e.g. cancer, viral diseases or Alzheimer's disease.

- 5 The virus or viroid can also be an animal-pathogenic or phytopathogenic virus or viroid. In this case the method according to the invention also permits the making available of drugs for the treatment of animal or plant diseases.

10

According to a further embodiment feature, segments of the dsRNA are in double-stranded form. The ends of the dsRNA can be modified to counteract a degradation in the cell or dissociation into the single strands.

- 15 Dissociation occurs in particular if low concentrations or short chain lengths are used. For the particularly effective inhibition of the dissociation, the cohesion of the double-stranded structure which is caused by the nucleotide pairs can be increased by at least one, preferably two, further chemical linkage(s). - A dsRNA according to the invention whose dissociation is reduced exhibits a higher stability to enzymatic and chemical degradation in the cell or in the organism.

- 25 The chemical linkage is expediently formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by ion-metal coordination. In accordance with a particularly advantageous embodiment, it may be produced at at least one, preferably at both, end(s).
- 30

It has furthermore proved to be advantageous for the chemical linkage to be formed by means of one or more

compound groups, the compound groups preferably being poly-(oxyphosphinicooxy-1,3-propandiol) and/or polyethylene glycol chains. The chemical linkage can also be formed by purine analogs which are used in the double-stranded structure instead of purines. It is also advantageous for the chemical linkage to be formed by azabenzene units introduced in the double-stranded structure. It can also be formed by branched nucleotide analogs which are used in the double-stranded structure instead of nucleotides.

It has proved to be expedient to use at least one of the following groups for producing the chemical linkage: methylene blue; bifunctional groups, preferably Bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxylbenzoyl)cystamin; 4-thiouracil, psoralen. Furthermore, the chemical linkage may also be formed by thiophosphoryl groups provided at the ends of the double-stranded region. The chemical linkage at the ends of the double-stranded region is preferably produced by triple-helix bonds.

The chemical linkage can expediently be induced by ultraviolet light.

The nucleotides of the dsRNA may be modified. This counteracts an activation, in the cell, of a protein kinase, PKR, dependent on double-stranded RNA. Advantageously, at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the double-stranded structure is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group. At least one nucleotide in at least one strand of the double-stranded structure may also be

a so-called "locked nucleotide" with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C methylene bridge. Several nucleotides are advantageously locked nucleotides.

5

In accordance with a further particularly advantageous embodiment, it is provided that the dsRNA is bound to, associated with or surrounded by at least one viral coat protein, which originates from a virus, is derived therefrom or has been produced synthetically. The coat protein may be derived from the polyoma virus. The coat protein may contain the virus protein 1 (VP1) and/or the virus protein 2 (VP2) of the polyoma virus. The use of such coat proteins is known, for example, from DE 196 18 797 A1. - The above-mentioned features considerably facilitate the introduction of the dsRNA into the cell.

15

When a capsid or capsid-type structure is formed from the coat protein, the one side preferably faces the interior of the capsid or capsid-type structure. The construct formed is particularly stable.

20

The dsRNA can be complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene. - The cell may be a vertebrate cell or a human cell.

25

At least two dsRNAs which differ from one another can be introduced into the cell, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes. As a result it is possible to inhibit simultaneously the expression of at least two different target genes. In order to suppress the expression of a protein kinase, PKR, that is

30

dependent on double-stranded RNA, in the cell, one of the target genes is preferably the PKR gene. As a result the PKR activity in the cell can be effectively suppressed.

- 5 In accordance with the invention, the object is also achieved by a drug having the features of Claims 32 and 63. It has surprisingly been shown that such a dsRNA is suitable as a drug for inhibiting the expression of a given gene in mammalian cells and in a phytopathogenic virus or viroid. In comparison with the use of single-stranded oligoribonucleotides, the inhibition is effected at concentrations which are lower by at least one order of magnitude. The drug according to the invention is highly effective. Lesser side effects are to be expected.
- 10
- 15

- Also in accordance with the invention, the object is achieved by using an oligoribonucleotide having the features of that of Claim 81. - Surprisingly such a dsRNA is suitable for producing a drug for the inhibition of the expression of a given gene. When using dsRNA, in comparison with the use of single-stranded oligoribonucleotides, the inhibition is already caused at concentrations which are lower by one order of magnitude.
- 20
- 25 The use according to the invention thus makes possible the production of particularly effective drugs.

- Also in accordance with the invention, the object is achieved by the use of a vector having the features of Claim 114. - The use of such a vector makes possible a particularly effective gene therapy.
- 30

With regard to advantageous embodiments of the drug and its use, reference is made to the description of the preceding features.

- 5 Exemplified embodiments of the invention are explained in further detail below with reference to the figures, in which:

- 10 Figure 1 shows the schematic representation of a plasmid for the *in vitro* transcription with T7 and SP6 polymerase.
- 15 Figure 2 shows RNA after electrophoresis on an 8% polyacrylamide gel and staining with ethidium bromide,
- 20 Figure 3 shows a representation of radioactive RNA transcripts after electrophoresis on an 8% polyacrylamide gel with 7 M urea by means of an instant imager, and
- 25 Figures 4 a - e show Texas Red and YFP fluorescence in murine fibroblasts.

Exemplified embodiment 1:

- 30 The inhibition of the transcription was detected by means of sequence-homologous dsRNA in an *in vitro* transcription system with a nuclear extract from human HeLa cells. The DNA template for this experiment was plasmid pCMV1200 which had been linearised by means of *Bam*Hi.

Production of the template plasmids:

The plasmid shown in Figure 1 was constructed for use in the enzymatic synthesis of the dsRNA. To this end, a polymerase chain reaction (PCR) with the "positive control DNA" of the HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* transcription kit from Promega, Madison, USA as DNA template was firstly carried out. One of the primers used contained the sequence of an *EcoRI* splice site and of the T7 RNA polymerase promoter as shown in sequence listing no. 1. The other primer contained the sequence of a *BamHI* splice site and of the SP6 RNA polymerase promoter according to sequence listing no. 2. Furthermore, both primers had, at their 3'-ends, regions which were identical with or complementary to the DNA template. The PCR was carried out by means of the "Taq PCR Core Kits" from Qiagen, Hilden, Germany following the manufacturer's instructions. 1.5 mM MgCl₂, in each case 200 µM dNTP, in each case 0.5 µM primer, 2.5 U Taq-DNA polymerase and roughly 100 ng of positive control DNA were used as template in PCR buffer in a volume of 100 µl. After the initial denaturation of the template DNA by heating to 94 °C for 5 minutes, amplification took place in 30 cycles of denaturation, each for 60 seconds at 94 °C, annealing for 60 seconds at 5 °C below the calculated melting temperature of the primer and polymerisation for 1.5 - 2 minutes at 72 °C. After a final polymerisation for 5 minutes at 72 °C, 5 µl of the reaction preparation were analysed by agarose gel electrophoresis. The length of the DNA fragment amplified thus was 400 base pairs, with 340 base pairs corresponding to the positive control DNA. The PCR product was purified, hydrolysed with *EcoRI* and *BamHI*

and, after repurification, used for the ligation with a pUC18 vector which had also been hydrolysed by *EcoRI* and *BamHI*. Transformation of *E. coli* XL1-blue took place. The plasmid obtained (pCMV5) carries a DNA fragment which is flanked at the 5'-end by the T7 promoter and at the 3'-end by the SP6 promoter. By linearising the plasmid with *BamHI*, it can be used *in vitro* with the T7-RNA polymerase for the run-off transcription of a single-stranded RNA which is 340 nucleotides long and shown in sequence listing no. 3. If the plasmid is linearised with *EcoRI*, it can be used for the run-off transcription with the SP6 RNA polymerase, giving rise to the complementary strand. In accordance with the method represented above, an RNA 23 nucleotides longer was also synthesised. To this end, a DNA represented in sequence listing no. 4 was ligated with the pUC18 vector via the *EcoRI* and *BamHI* splice sites.

Plasmid pCMV 120 was constructed as DNA template for the *in vitro* transcription with HeLa nuclear extract. To this end, a 1191 bp *EcoRI/BamHI* fragment of the positive control DNA contained in the HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* transcription kit was amplified by means of PCR. The amplified fragment contains the 828 bp "immediate early" CMV promoter and a 363 bp transcribable DNA fragment. The PCR product was ligated with the vector pGEM-T via "T-overhang" ligation. A *BamHI* splice site is located at the 5' end of the fragment. The plasmid was linearised by hydrolysis with *BamHI* and used as a template for the run-off transcription.

In vitro transcription of the complementary single strands:

pCMV5 plasmid DNA was linearised with *EcoRI* or *BamHI*. It was used as a DNA template for an *in vitro* transcription of the complementary RNA individual strands with SP6 or T7 RNA polymerase. The "riboprobe *in vitro* transcription" system from Promega, Madison, USA was used for this purpose. Following the manufacturer's instructions, 2 μ g of linearised plasmid DNA were incubated in 100 μ l of transcription buffer and 40 U T7 or SP6 RNA polymerase for 5 - 6 hours at 37 °C. The DNA template was subsequently degraded by the addition of 2.5 μ l RNase-free DNase RQ1 and incubation for 30 minutes at 37°C. The transcription preparation was made up to 300 μ l with H₂O and purified by phenol extraction. The RNA was precipitated by addition of 150 μ l 7 M ammonium acetate and 1125 μ l ethanol and stored at -65 °C until hybridisation.

Production of the RNA double strands:

- For the hybridisation, 500 μ l of the single-stranded RNA which had been stored in ethanol and precipitated were centrifuged off. The resulting pellet was dried and taken up in 30 μ l of PIPES buffer, pH 6.4, in the presence of 80% formamide, 400 mM NaCl and 1 mM EDTA. In each case 15 μ l of the complementary single strands were combined and heated for 10 minutes to 85 °C. Then the preparations were incubated at 50 °C overnight and cooled to room temperature.
- Only approximately equimolar amounts of the two single strands were used in the hybridisation. As a result the dsRNA preparations contained single-stranded RNA (ssRNA) as contaminant. To remove these ssRNA contaminants, the

preparations were treated, after hybridisation, with the single-strand-specific ribonucleases RNase A from bovine pancreas and RNase T1 from *Aspergillus oryzae*. RNase A is an endoribonuclease which is specific for pyrimidines. RNase T1 is an endoribonuclease which preferably splices to the 3'-side of guanosines. dsRNA is no substrate for these ribonucleases. For the RNase treatment, 1.2 μ l of RNaseA in a concentration of 10 mg/ml and 2 μ l of RNaseT1 in a concentration of 290 μ g/ml was added to the preparations in 300 μ l of Tris, pH 7.4, 300 mM NaCl and 5 mM EDTA. The preparations were incubated for 1.5 hours at 30 °C. Afterwards the RNases were denatured by the addition of 5 μ l of proteinase K in a concentration of 20 mg/ml and also 10 μ l of 20 % SDS and incubation for 30 minutes at 37 °C. The dsRNA was purified by phenol extraction and precipitated with ethanol. To be able to verify the completeness of the RNase digestion, two control preparations were treated with ssRNA similarly to the hybridisation preparations.

The dried pellet was taken up in 15 μ l of TE buffer, pH 6.5, and subjected to native polyacrylamide electrophoresis on an 8 % gel. The acrylamide gel was subsequently stained in an ethidium bromide solution and rinsed in a water bath. Figure 2 shows the RNA which had been made visible on a UV transilluminator. The *sense* RNA which had been applied to lane 1 and the *antisense* RNA which had been applied to lane 2 displayed a different migration behaviour under the chosen conditions than the dsRNA of the hybridisation preparation which had been applied to lane 3. The RNase-treated *sense* and *antisense* RNA, which had been applied to lanes 4 and 5 respectively, produced no visible band. This shows that

the single-stranded RNAs had been completely degraded. The RNase-treated dsRNA of the hybridisation preparation which had been applied to lane 6 is resistant to RNase treatment. The band which migrates faster in the native gel in comparison with the dsRNA applied to lane 3 results from dsRNA which is free from ssRNA. In addition to the dominant main band, weaker bands which migrate faster appear after the RNase treatment.

10 *In vitro* transcription test with human nuclear extract:

Using the HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* transcription kit from Promega, Madison, USA, the transcription efficiency of the above-mentioned DNA fragment, which was contained in the plasmid pCMV1200 and was homologous to the "positive control DNA", was determined in the presence of the sequence-homologous dsRNA (dsRNA-CMV5). Furthermore, the effect of the dsRNA (dsRNA-YFP) without sequence homology, which corresponds to the "yellow fluorescent protein" (YFP) gene, was studied. This dsRNA had been produced similarly to the dsRNA with sequence homology. The sequence of a strand of this dsRNA can be found in sequence listing no. 5. The plasmid pCMV1200 was used as template for the *run-off* transcription. It carries the "immediate early" promoter of the cytomegalia virus, which is recognised by the eukaryotic RNA polymerase II, and a transcribable DNA fragment. Transcription was carried out by means of the HeLa nuclear extract, which contains all necessary proteins for a transcription. By addition of [³²P]rGTP to the transcription preparation, radioactively marked transcript was obtained. The [³²P]rGTP which was used had a specific activity of 400 Ci/mmol, 10 mCi/ml. For

each preparation, 3 mM MgCl_2 , in each case 400 μM rATP, rCTP, rUTP, 16 μM rGTP, 0.4 μM [^{32}P] rGTP and depending on the experiment 1 fmol of linearised plasmid DNA and various amounts of dsRNA in transcription buffer were used. Each preparation was made up to a volume of 8.5 μl with H_2O . The preparations were mixed carefully. To start the transcription, 4 U HeLa nuclear extract in a volume of 4 μl was added and incubated for 60 minutes at 30 °C. The reaction was stopped by the addition of 87.5 μl of quench mix which had been heated to 30°C. To remove the proteins, the preparations were treated with 100 μl of phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1, v/v/v), saturated with TE buffer, pH 5.0 and were mixed vigorously for 1 minute. For phase separation, the preparations were centrifuged for roughly 1 minute at 12,000 rpm and the upper phase was transferred into a new reaction vessel. 250 μl of ethanol was added to each preparation. The preparations were mixed thoroughly and incubated for at least 15 minutes on dry ice/methanol. To precipitate the RNA, the preparations were centrifuged for 20 minutes at 12000 rpm and 4°C. The supernatant was discarded. The pellet was dried for 15 minutes in the vacuum and resuspended in 10 μl of H_2O . 10 μl of denaturing test buffer was added to each preparation. The separation of the free GTP from the transcript formed took place by means of denaturing polyacrylamide gel electrophoresis on an 8% gel with 7 M urea. The RNA transcripts formed upon transcription with HeLa nuclear extract in denaturing test buffer were heated for 10 minutes to 90 °C and 10 μl of it was immediately applied to the freshly washed test pockets. Electrophoresis took place at 40 mA. The amount of the radioactive ssRNA

formed during transcription was analysed after electrophoresis with the aid of an *instant imager*.

Figure 3 shows the radioactive RNA from a representative test, represented by means of the *instant imager*. Samples obtained from the following transcription preparations were applied:

- | | | |
|----|----------|--|
| | lane 1: | without template DNA, without dsRNA; |
| 10 | lane 2: | 50 ng of template DNA, without dsRNA; |
| | lane 3: | 50 ng of template DNA, 0.5 μ g dsRNA-YFP; |
| | lane 4: | 50 ng of template DNA, 1.5 μ g dsRNA-YFP; |
| | lane 5: | 50 ng of template DNA, 3 μ g dsRNA-YFP; |
| | lane 6: | 50 ng of template DNA, 5 μ g dsRNA-YFP; |
| 15 | lane 7: | without template DNA, 1.5 dsRNA-YFP; |
| | lane 8: | 50 ng of template DNA, without dsRNA |
| | lane 9: | 50 ng of template DNA, 0.5 μ g dsRNA-CMV5; |
| | lane 10: | 50 ng of template DNA, 1.5 μ g dsRNA-CMV5; |
| | lane 11: | 50 ng of template DNA, 3 μ g dsRNA-CMV5; |
| 20 | lane 12: | 50 ng of template DNA, 5 μ g dsRNA-CMV5; |

A clear reduction in the amount of transcript in the presence of dsRNA with sequence homology was displayed in comparison with the control preparation without dsRNA and also with the preparations with dsRNA-YFP without sequence homology. The positive control in lane 2 shows that radioactive transcript was formed during the *in vitro* transcription with HeLa nuclear extract. The preparation is used for comparison with the transcription preparations which had been incubated in the presence of dsRNA. Lanes 3 to 6 show that the addition of non-sequence-specific dsRNA-YFP has no effect on the amount of transcript formed. Lanes 9 to 12 show that the

addition of an amount of between 1.5 and 3 μ g of sequence-specific dsRNA-CMV5 results in a reduction in the amount of transcript formed. To exclude that the effects observed are based not on the dsRNA, but on any contamination which might have also occurred unintentionally during the manufacture of the dsRNA, a further control was carried out. Single-stranded RNA was transcribed as described above and was subsequently subjected to the RNase treatment. It could be shown by means of native polyacrylamide gel electrophoresis that the ssRNA had been completely degraded. Like the hybridisation preparations, this preparation was subjected to phenol extraction and ethanol precipitation and subsequently taken up in TE buffer. In this manner a sample was obtained which did not contain any RNA, but had been treated with the same enzymes and buffers as the dsRNA. Lane 8 shows that the addition of this sample had no effect on the transcription. The reduction in the transcript upon addition of sequence-specific dsRNA can therefore be ascribed unequivocally to the dsRNA itself. The reduction of the amount of transcript of a gene in the presence of dsRNA in a human transcription system indicates an inhibition of the expression of the corresponding gene. This effect can be attributed to a novel mechanism caused by the dsRNA.

Exemplified embodiment 2:

The murine fibroblast cell line NIH3T3, ATCC CRL-1658 was used as the test system for these *in-vivo* experiments. The YFP gene was introduced into the nuclei with the aid of microinjection. The expression of the YFP was studied under the effect of simultaneously cotransfected dsRNA

with sequence homology. This dsRNA-YFP is homologous with the 5' region of the YFP gene over a length of 315 bp. The nucleotide sequence of a strand of the dsRNA-YFP is reproduced in sequence listing no. 5. Evaluation
5 under the fluorescence microscope was carried out for 3 hours after injection by reference to the green-yellow fluorescence of the YFP formed.

10 Construction of the template plasmid and production of the dsRNA:

A plasmid was constructed following the same principle as described in Exemplified Embodiment 1 to act as a template for the production of the YFP-dsRNA by means of
15 T7 and SP6 *in vitro* transcription. Using the primer *Eco_T7_YFP* as shown in sequence listing no. 6 and *Bam_SP6_YFP* as shown in sequence listing no. 7, the desired gene fragment was amplified by means of PCR and used to produce the dsRNA similarly to the above
20 description. The dsRNA-YFP obtained is identical to the dsRNA used in Exemplified Embodiment 1 as a non-sequence-specific control.

A dsRNA linked chemically at the 3'-end of the RNA as shown in sequence listing no. 8 to the 5'-end of the complementary RNA via a C18 linker group was produced (L-dsRNA). To this end, synthons modified with disulfide bridges were used. The 3'-terminal synthon is bound to the solid carrier via the 3'-carbon with an aliphatic
25 linker group via a disulfide bridge. With the 5'-terminal synthon of the complementary oligoribonucleotide which is complementary to the 3'-terminal synthon of the one oligoribonucleotide, the 5'-trityl protecting group
30

is bound via a further aliphatic linker and a disulfide bridge. After synthesis of the two single strands, removal of the protecting groups and hybridisation of the complementary oligoribonucleotides, the thiol groups produced are brought into spatial vicinity. The single strands are linked to each other by oxidation via their aliphatic linkers and a disulfide bridge. Purification with the aid of HPLC subsequently takes place.

10 Preparation of the cell cultures:

The cells were incubated in DMEM with 4.5 g/l glucose, 10 % foetal bovine serum in culture dishes at 37 °C under a 7.5 % CO₂ atmosphere and passaged before reaching confluence. The detachment of the cells took place with trypsin/EDTA. To prepare for microinjection, the cells were transferred into Petri dishes and incubated further until microcolonies were formed.

20 Microinjection:

For the microinjection, the culture dishes were removed from the incubator for approx. 10 minutes. Approximately 50 nuclei were injected singly for each preparation within a marked area using the microinjection system AIS from Carl Zeiss, Göttingen, Germany. The cells were subsequently incubated for three more hours. For the microinjection, borosilicate glass capillaries from Hilgenberg GbmH, Malsfeld, Germany, with a diameter of less than 0.5 μm at the tip were prepared. The microinjection was carried out using a micromanipulator from Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan. The injection time was 0.8 seconds, the pressure approx.

100 hPa. For the transfection the plasmid pCDNA-YFP was used, which contains an approximately 800 bp *Bam*HI/*Eco*RI fragment with the gene of the YFP in the vector pCDNA3. The samples injected into the nuclei contained 0.01 μ g/ μ l
 5 pCDNA-YFP and also Texas Red coupled to dextran-70000 in 14 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM KPO_4 , pH 7.5. Approximately 100 pl of RNA with a concentration of 1 μ M, or, in the case of the L-dsRNA, 375 μ M, were additionally added.

10 The cells were studied under a fluorescence microscope with excitation with light of the excitation wavelength of Texas Red, 568 nm, or of YFP, 488 nm. Individual cells were documented by means of a digital camera. Figures 4a-e show the result for NIH3T3 cells. In the cells
 15 shown in Figure 4a sense-YFP-ssRNAa has been injected, in Figure 4b antisense-YFP-ssRNA, in Figure 4c dsRNA-YFP, in Figure 4d no RNA and in Figure 4e L-dsRNA.

The field on the left in each case displays the
 20 fluorescence of cells which were excited at 568 nm. The fluorescence of the same cells with an excitation at 488 nm can be seen on the right. The Texas Red fluorescence of all the cells represented shows that the injection solution had been applied successfully into the nuclei
 25 and affected cells were still alive after three hours. Dead cells no longer showed any Texas Red fluorescence.

The right-hand field of Figures 4a and b in each case show that the expression of YFP was not visibly inhibited
 30 when the single-stranded RNA was injected into the nuclei. The right-hand field in Figure 4c shows cells whose YFP fluorescence was no longer detectable after the injection of dsRNA-YFP. Figure 4d shows cells into which

no RNA was injected as a control. The cell represented in Figure 4e shows YFP fluorescence which can no longer be detected as a result of the injection of the L-dsRNA, which has regions with sequence homology to the YFP gene.

- 5 This result proves that even shorter dsRNAs can also be used for the specific inhibition of the gene expression in mammals when the double strands are stabilised by chemically linking the single strands.

Bibliography:

- 5 Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X. & Komiyama, M. (1999). Photoregulation der Bildung und Dissoziation eines DNA-Duplexes durch *cis-trans*-Isomerisierung einer Azobenzoleinheit. *Angew. Chem.* **111**, 2547-2549.
- 10 Azhayeva, E., Azhayev, A., Auriola, S., Tengvall, U., Urtti, A. & Lönnberg, H. (1997). Inhibitory properties of double helix forming circular oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4954-4961.
- 15 Castelli, J., Wood, K.A. & Youle, R.J. (1998). The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* **52**, 386-390.
- 20 Dolinnaya, N.G., Blumenfeld, M., Merenkova, I., Oretskaya, T.S., Krynetskaya, N.F., Ivanovskaya, M.G., Vasseur, M. & Shabarova, Z.A.. (1993) Oligonucleotide circulization by template-directed chemical ligation. *Nucl. Acids Res.* **21**, 5403-5407.
- 25 Expert-Bezancon, A., Milet, M. & Carbon, P. (1983). Precise localization of several covalent RNA-RNA cross-link in *Escherichia coli* 16S RNA. *Eur. J. Biochem.* **137**, 267-274.
- 30 Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

- Gao, H., Yang, M., Patel, R. & Cook, A.F.. (1995), Circulization of oligonucleotides by disulfide bridge formation. *Nucl. Acids Res.* **23**, 2025-2029.
- 5 Gryaznov, S.M. & Letsinger, R.L. (1993). Template controlled coupling and recombination of oligonucleotide blocks containg thiophosphoryl groups. *Nucl. Acids. Res.* **21**, 1403-1409.
- 10 Kaufman, R.J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: A new role for an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11693-11695.
- 15 Lipson, S.E. & Hearst, J.E. (1988). Psoralen cross-linking of ribosomal TNA. In *Methods in Enzymology* Anonymous pp. 330-341.
- 20 Liu, Z.R., Sargueil, B. & Smith, C.W. (1998). Detection of a novel ATP-dependent cross-linked protein at the 5' splice site-U1 small nuclear RNA duplex by methylene bluemediated photo-cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6910-6920.
- 25 Micura, R. (1999). Cyclic oligoribonucleotides (RNA) by solidphase synthesis. *Chem. Eur. J.* **5**, 2077-2082
- 30 Skripkin, E., Isel, C., Marquet, R., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1996). Psoralen crosslinking between human immunodeficiency virus type 1 RNA and primer tRNA₃^{Lys}. *Nucl. Acids Res.* **24**, 509-514.

- Wang, S. & Kool, E.T. (1994). Circular RNA oligonucleotides. Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular DNAs. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2326-2333.
- 5 Wang, Z. & Rana, T.M. (1996). RNA conformation in the Tat-TAR complex determined by site-specific photo-cross-linking. *Biochem.* **35**, 6491-6400.
- 10 Watkins, K.P. & Agabian, N. (1991). *In vivo* UV cross-linking of U snRNAs that participate in trypanosome transplicing. *Genes & Development* **5**, 1859-1869.
- 15 Wengel, J. (1999). Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Acc. Chem. Res.* **32**, 301-310.
- 20 Zwieb, C., Ross, A., Rinke, J., Meinke, M. and Brimacombe, R. (1978). Evidence for RNA-RNA cross-link formation in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucl. Acids Res.* **5**, 2705-2720.

SEQUENCE LISTING

<110> Kreutzer Dr., Roland
 Limmer Dr., Stephan
 5 <120> Method and drug for the inhibition of the
 expression of a given gene
 <130> 400968
 <140>
 <141>
 10 <150> 199 03 713.2
 <151> 1999-01-30
 <150> 199 56 568.6
 <151> 1999-11-24
 <160> 8
 15 <170> Patentin Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 20 <220>
 <223> Description of the artificial sequence: EcoRI
 splice site, T7 RNA polymerase promoter
 <400> 1

 25
 ggaattctaa tacgactcac tatagggcga tcagatctct agaag 45

 <210> 2
 30 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220>

<223> Description of the artificial sequence:
 BamHI splice site, SP6 RNA polymerase promoter
 <400> 2

5

gggatccatt taggtgacac tatagaatac ccatgatcgc gtagtcgata 50

<210> 3

10 <211> 340

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: RNA which
 15 corresponds to a sequence from the positive control DNA
 of the HeLaScribe Nuclear Extract in vitro transcription
 kit from Promega

<400> 3

20 ucagaucucu agaagcuuua augcggguagu uuaucaacagu uaaaauugcua acgcagucag 60
 gcaccgugua ugaaaucuaa caaugcgcuc aucgucaucc ucggcacccgu caccucggau 120
 gcuguaggca uaggcuuggu uaugccggua cugccgggcc ucungcgga uaucguccau 180
 uccgacagca ucgccaguca cuauggcgug cugcuagcgc uauaugcguu gaugcauuu 240
 cuaugcgcac ccguucucgg agcacugucc gaccgcuuug gccgccgcc aguccugcuc 300
 25 gcuuucguac uuggagccac uaucgacuac gcgaucaugg 340

<210> 4

<211> 363

30 <212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> description of the artificial sequence: DNA, which
 corresponds to a sequence from the positive control DNA

of the HeLaScribe Nuclear Extract in vitro transcription
kit from Promega.

<400>

5 tcagatctct agaagcttta atgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag 60

gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgtcatcc tcggcacagt caccctggat 120
gctgtaggca taggettggg tatgcgggta ctgccgggccc tcttgcgga tatcgtccat 180
10 tccgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc tatatgcgtt gatgcaattt 240
ctatgcgcac cgtttctcgg agcactgtcc gaccgctttg gccgcccgc agtcctgctc 300
gcttcgctac ttggagccac tatcgactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtcctgtgg 360
atc 363

15 <210> 5

<211> 315

<212> RNA

<213> artificial sequence

<220>

20 <223> description of the artificial sequence: sequence
from the YFP gene

<400> 5

auggugagca agggcgagga gcugucacc gggguggugc ccauccuggu cgagcuggac 60
25 ggcgacguaa acggccacaa guucagcgug uccggcgagg gcgagggcga ugccaccuac 120
ggcaagcuga ccugaaguu caucugcacc accggcaagc ugcccugucc cuggcccacc 180
cucgugacca ccugaccua cggcgugcag ugcucagcc gcuaccccga ccacaugaag 240
cagcacgacu ucuucaaguc cgccaugccc gaaggcuacg uccaggagcg caccaucuuu 300
uucaaggacg acggc 315

30

<210> 6

<211> 52

<212> DNA

<213> artificial sequence

35 <220>

<223> description of the artificial sequence: EcoRI
splice site, T7 RNA polymerase promoter, complementary
region to the YFP gene

<400> 6

5

ggaattctaa tacgactcac tatagggcga atggtgagca agggcgagga gc 52

<210> 7

<211> 53

10 <212> DNA

<213> artificial sequence

<220>

<223> description of the artificial sequence: BamHI
splice site, SP6 RNA polymerase promoter, complementary
region to the YFP gene

15

<400> 7

gggatccatt taggtgacac tatagaatac gccgtcgtcc ttgaagaaga tgg 53

20

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> artificial sequence

25 <220>

<223> description of the artificial sequence: RNA
corresponding to a sequence from the YFP gene

<400> 8

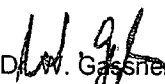
30

ucgagcugga cggcgacgua a

21

European Patent Publication EP 1 144 623 B1

I, Dr.-Ing. Wolfgang Gassner, Nägelsbachstrasse 49A, 91052 Erlangen, hereby certify that I am conversant with the German language and that the following is a true and correct translation made by me into the English language of the claims of the above European Patent Publication to the best of my knowledge and belief.


Dr. W. Gassner
Patent Attorney

November 14, 2002

New Patent Claims

- 5
1. Method for inhibiting the expression of a given
target gene in a cell in vitro, where an
oligoribonucleotide with double-stranded structure
(dsRNA) formed by two separate RNA single strands
10 is introduced into the cell, where one strand of
the dsRNA has a region which is complementary to
the target gene,
characterized in that
the complementary region has less than 25
15 successive nucleotide pairs.
 2. Method according to claim 1, where the dsRNA is
enclosed by micellar structures, preferably by
liposomes.
20
 3. Method according to either of the preceding
claims, where the dsRNA is enclosed by natural
viral capsids or by chemically or enzymatically
produced artificial capsids or structures derived
25 therefrom.
 4. Method according to one of the preceding claims,
where the target gene is expressed in eukaryotic
cells.
30
 5. Method according to one of the preceding claims,
where the target gene is selected from the
following group: oncogene, cytokin gene, Id-
protein gene, development gene, prion gene.
35
 6. Method according to one of the preceding claims,
where the target gene is expressed in pathogenic
organisms, preferably in plasmodia.

7. Method according to one of the preceding claims,
where the target gene is part of a virus or
viroid.
- 5 8. Method according to claim 7, where the virus is a
virus or viroid which is pathogenic for humans.
- 10 9. Method according to claim 7, where the virus or
viroid is a virus or viroid which is pathogenic
for animals or phytopathogenic.
- 15 10. Method according to one of the preceding claims,
where segments of the dsRNA are in double-stranded
form.
- 20 11. Method according to one of the preceding claims,
where the ends of the dsRNA are modified in order
to counteract degradation in the cell or
dissociation into the single strands.
- 25 12. Method according to one of the preceding claims,
where the cohesion of the double-stranded
structure, which is caused by the complementary
nucleotide pairs, is increased by at least one,
preferably two, further chemical linkage(s).
- 30 13. Method according to one of the preceding claims,
where the chemical linkage is formed by a covalent
or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic
interactions, preferably van-der-Waals or stacking
interactions, or by metal-ion coordination.
- 35 14. Method according to one of the preceding claims,
where the chemical linkage is generated at at
least one, preferably both, ends of the double-
stranded structure.

15. Method according to one of the preceding claims,
where the chemical linkage is formed by means of
one or more compound groups, the compound groups
preferably being poly(oxyphosphinicooxy-
5 1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol
chains.
16. Method according to one of the preceding claims,
where the chemical linkage is formed by purine
10 analogs used in the double-stranded structure in
place of purines.
17. Method according to one of the preceding claims,
where the chemical linkage is formed by azabenzene
15 units introduced into the double-stranded
structure.
18. Method according to one of the preceding claims,
where the chemical linkage is formed by branched
20 nucleotide analogs used in the double-stranded
structure in place of nucleotides.
19. Method according to one of the preceding claims,
where at least one of the following groups is used
25 for generating the chemical linkage: methylene
blue; bifunctional groups, preferably
bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-
benzoyl)cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
- 30 20. Method according to one of the preceding claims,
where the chemical linkage is formed by
thiophosphoryl groups provided at the ends of the
double-stranded structure.
- 35 21. Method according to one of the preceding claims,
where the chemical linkage at the ends of the
double-stranded structure is formed by triple-
helix bonds.

22. Method according to one of the preceding claims,
where at least one 2'-hydroxyl group of the
nucleotides of the dsRNA in the double-stranded
structure is replaced by a chemical group,
preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
23. Method according to one of the preceding claims,
where at least one nucleotide in at least one
strand of the double-stranded structure is a
locked nucleotide with a sugar ring which is
chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-
methylene bridge.
24. Method according to one of the preceding claims,
where the dsRNA is bound to, associated with or
surrounded by, at least one viral coat protein
which originates from a virus, is derived
therefrom or has been prepared synthetically.
25. Method according to one of the preceding claims,
where the coat protein is derived from
polyomavirus.
26. Method according to one of the preceding claims,
where the coat protein contains the polyomavirus
virus protein 1 (VP1) and/or virus protein 2
(VP2).
27. Method according to one of the preceding claims,
where, when a capsid or capsid-type structure is
formed from the coat protein, one side faces the
interior of the capsid or capsid-type structure.
28. Method according to one of the preceding claims,
where one strand of the dsRNA is complementary to
the primary or processed RNA transcript of the
target gene.

AMENDED SHEET

29. Method according to one of the preceding claims,
where the cell is a vertebrate cell or a human
cell.
- 5
30. Method according to one of the preceding claims,
where at least two dsRNAs which differ from each
other are introduced into the cell, where at least
segments of one strand of each dsRNA are
complementary to in each case one of at least two
different target genes.
- 10
31. Method according to one of the preceding claims,
where one of the target genes is the PKR gene.
- 15
32. Medicament with at least one oligoribonucleotide
with double-stranded structure (dsRNA) formed by
two separate RNA single strands for inhibiting the
expression of a given target gene, where one
strand of the dsRNA has a region which is
complementary to the target gene,
characterized in that
the complementary region has less than 25
successive nucleotide pairs.
- 20
- 25
33. Medicament according to claim 32, where the dsRNA
is enclosed by micellar structures, preferably by
liposomes.
- 30
34. Medicament according to either of claims 32 or 33,
where the dsRNA is enclosed by natural viral
capsids or by chemically or enzymatically produced
artificial capsids or structures derived
therefrom.
- 35
35. Medicament according to one of claims 32 to 34,
where the target gene can be expressed in
eukaryotic cells.

AMENDED SHEET

36. Medicament according to one of claims 32 to 35,
where the target gene is selected from the
following group: oncogene, cytokin gene, Id-
5 protein gene, development gene, prion gene.
37. Medicament according to one of claims 32 to 36,
where the target gene can be expressed in
pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
10
38. Medicament according to one of claims 32 to 37,
where the target gene is part of a virus or
viroid.
- 15 39. Medicament according to claim 38, where the virus
is a virus or viroid which is pathogenic for
humans.
- 20 40. Medicament according to claim 38, where the virus
or viroid is a virus or viroid which is pathogenic
for animals.
- 25 41. Medicament according to one of claims 32 to 40,
where segments of the dsRNA are in double-stranded
form.
- 30 42. Medicament according to one of claims 32 to 40,
where the ends of the dsRNA are modified in order
to counteract degradation in the cell or
dissociation into the single strands.
- 35 43. Medicament according to one of claims 32 to 42,
where the cohesion of the double-stranded
structure, which is caused by the complementary
nucleotide pairs, is increased by at least one,
preferably two, further chemical linkage(s).

44. Medicament according to one of claims 32 to 43,
where the chemical linkage is formed by a covalent
or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic
interactions, preferably van-der-Waals or stacking
interactions, or by metal-ion coordination.
45. Medicament according to one of claims 32 to 44,
where the chemical linkage is generated at at
least one, preferably both, ends of the double-
stranded structure.
46. Medicament according to one of claims 32 to 45,
where the chemical linkage is formed by means of
one or more compound groups, the compound groups
preferably being poly(oxyphosphinicooxy-
1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol
chains.
47. Medicament according to one of claims 32 to 46,
where the chemical linkage is formed by purine
analogs used in the double-stranded structure in
place of purines.
48. Medicament according to one of claims 32 to 47,
where the chemical linkage is formed by azabenzene
units inserted into the double-stranded structure.
49. Medicament according to one of claims 32 to 48,
where the chemical linkage is formed by branched
nucleotide analogs used in the double-stranded
structure in place of nucleotides.
50. Medicament according to one of claims 32 to 49,
where at least one of the following groups is used
for generating the chemical linkage: methylene
blue; bifunctional groups, preferably bis(2-
chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxylbenzoyl)-
cystamine; 4-thiouracil; psoralene.

51. Medicament according to one of claims 32 to 50,
where the chemical linkage is formed by
thiophosphoryl groups provided at the ends of the
double-stranded structure.
52. Medicament according to one of claims 32 to 51,
where the chemical linkage are [sic] triple-helix
bonds provided at the ends of the double-stranded
structure.
53. Medicament according to one of claims 32 to 52,
where at least one 2'-hydroxyl group of the
nucleotides of the dsRNA in the double-stranded
structure is replaced by a chemical group,
preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
54. Medicament according to one of claims 32 to 53,
where at least one nucleotide in at least one
strand of the double-stranded structure is a
locked nucleotide with a sugar ring which is
chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-
methylene bridge.
55. Medicament according to one of claims 32 to 54,
where the dsRNA is bound to, associated with or
surrounded by, at least one viral coat protein
which originates from a virus, is derived
therefrom or has been prepared synthetically.
56. Medicament according to one of claims 32 to 55,
where the coat protein is derived from the
polyomavirus.
57. Medicament according to one of claims 32 to 56,
where the coat protein contains the polyomavirus
virus protein 1 (VP1) and/or virus protein 2
(VP2).

58. Medicament according to one of claims 32 to 57,
where, when a capsid or capsid-type structure is
formed from the coat protein, one side faces the
interior of the capsid or capsid-type structure.
59. Medicament according to one of claims 32 to 58,
where one strand of the dsRNA is complementary to
the primary or processed RNA transcript of the
target gene.
60. Medicament according to one of claims 32 to 59,
where the cell is a vertebrate cell or a human
cell.
61. Medicament according to one of claims 32 to 60,
where at least two dsRNAs which differ from each
other are contained in the medicament, where at
least segments of one strand of each dsRNA are
complementary to in each case one of at least two
different target genes.
62. Medicament according to claim 61, where one of the
target genes is the PKR gene.
63. Active ingredient with at least one
oligoribonucleotide with double-stranded structure
(dsRNA) formed by two separate RNA single strands
for inhibiting the expression of a given target
gene, where one strand of the dsRNA has a region
which is complementary to the target gene, and
where the target gene is part of a phytopathogenic
virus or viroid,
characterized in that
the complementary region has less than 25
successive nucleotide pairs.

64. Active ingredient according to claim 63, where the target gene can be expressed in eukaryotic cells.
- 5 65. Active ingredient according to claim 63 or 64, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.
- 10 66. Active ingredient according to one of claims 63 to 65, where the ends of the dsRNA are modified in order to counteract degradation in the cell or dissociation into the single strands.
- 15 67. Active ingredient according to one of claims 63 to 66, where the cohesion of the double-stranded structure, which is caused by the complementary nucleotide pairs, is increased by at least one, preferably two, further chemical linkage(s).
- 20 68. Active ingredient according to one of claims 63 to 67, where the chemical linkage is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
- 25 69. Active ingredient according to one of claims 63 to 68, where the chemical linkage is generated at at least one, preferably both, ends of the double-stranded structure.
- 30 70. Active ingredient according to one of claims 63 to 69, where the chemical linkage is formed by means of one or more compound groups, the compound groups preferably being poly(oxyphosphinicoxy-1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol chains.
- 35

71. Active ingredient according to one of claims 63 to 70, where the chemical linkage is formed by purine analogs used in the double-stranded structure in place of purines.
- 5
72. Active ingredient according to one of claims 63 to 71, where the chemical linkage is formed by azabenzene units inserted into the double-stranded structure.
- 10
73. Active ingredient according to one of claims 63 to 72, where the chemical linkage is formed by branched nucleotide analogs used in the double-stranded structure in place of nucleotides.
- 15
74. Active ingredient according to one of claims 63 to 73, where at least one of the following groups is used for generating the chemical linkage: methylene blue; bifunctional groups, preferably bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
- 20
75. Active ingredient according to one of claims 63 to 74, where the chemical linkage is formed by thiophosphoryl groups provided at the ends of the double-stranded structure.
- 25
76. Active ingredient according to one of claims 63 to 75, where the chemical linkage are triple-helix bonds provided at the ends of the double-stranded structure.
- 30
77. Active ingredient according to one of claims 63 to 76, where at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the double-stranded structure is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
- 35

78. Active ingredient according to one of claims 63 to 77, where at least one nucleotides at least one strand of the double-stranded structure is a locked nucleotide with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-methylene bridge.
79. Active ingredient according to one of claims 63 to 78, where one strand of the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
80. Active ingredient according to one of claims 63 to 79, where at least two dsRNAs which differ from each other are contained in the active ingredient, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.
81. Use of an oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) formed by two separate RNA single strands or preparing a medicament or active ingredient for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region which is complementary to the target gene, characterized in that the complementary region has less than 25 successive nucleotide pairs.
82. Use according to claim 81, where the dsRNA is enclosed by micellar structures, preferably by liposomes.
83. Use according to either of claims 81 or 82, where the dsRNA is enclosed by natural viral capsids or by chemically or enzymatically produced artificial capsids or structures derived therefrom.

84. Use according to one of claims 81 to 83, where the target gene can be expressed in eukaryotic cells.
- 5 85. Use according to one of claims 81 to 84, where the target gene is selected from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.
- 10 86. Use according to one of claims 81 to 85, where the target gene can be expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
87. Use according to one of claims 81 to 86, where the target gene is part of a virus or viroid.
- 15 88. Use according to claim 87, where the virus is a virus or viroid which is pathogenic for humans.
- 20 89. Use according to claim 87, where the virus or viroid is a virus or viroid which is pathogenic for animals or phytopathogenic.
90. Use according to one of claims 81 to 89, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.
- 25 91. Use according to one of claims 81 to 90, where the ends of the dsRNA are modified in order to counteract degradation in the cell or dissociation into the single strands.
- 30 92. Use according to one of claims 81 to 91, where the cohesion of the double-stranded structure, which is caused by the complementary nucleotide pairs, is increased by at least one, preferably two, further chemical linkage(s).
- 35

AMENDED SHEET

93. Use according to one of claims 81 to 92, where the chemical linkage is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
94. Use according to one of claims 81 to 93, where the chemical linkage is generated at at least one, preferably both, ends of the double-stranded structure.
95. Use according to one of claims 81 to 94, where the chemical linkage is formed by means of one or more compound groups, the compound groups preferably being poly(oxyphosphinicooxy-1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol chains.
96. Use according to one of claims 81 to 95, where the chemical linkage is formed by purine analogs used in the double-stranded structure in place of purines.
97. Use according to one of claims 81 to 96, where the chemical linkage is formed by azabenzene units introduced into the double-stranded structure.
98. Use according to one of claims 81 to 97, where the chemical linkage is formed by branched nucleotide analogs used in the double-stranded structure in place of nucleotides.
99. Use according to one of claims 81 to 98, where at least one of the following groups is used for generating the chemical linkage: methylene blue; bifunctional groups, preferably bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxylbenzoyl)-cystamine; 4-thiouracil; psoralene.

100. Use according to one of claims 81 to 99, where the chemical linkage is formed by thiophosphoryl groups attached to the ends of the double-stranded structure.
- 5
101. Use according to one of claims 81 to 100, where the chemical linkage at the ends of the double-stranded structure is formed by triple-helix bonds.
- 10
102. Use according to one of claims 81 to 101, where at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the double-stranded structure is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
- 15
103. Use according to one of claims 81 to 102, where at least one nucleotide in at least one strand of the double-stranded structure is a locked nucleotide with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-methylene bridge.
- 20
104. Use according to one of claims 81 to 103, where the dsRNA is bound to, associated with or surrounded by, at least one viral coat protein which originates from a virus, is derived therefrom or has been prepared synthetically.
- 25
105. Use according to one of claims 81 to 104, where the coat protein is derived from polyomavirus.
- 30
106. Use according to one of claims 81 to 105, where the coat protein contains the polyomavirus virus protein 1 (VP1) and/or virus protein 2 (VP2).
- 35
107. Use according to one of claims 81 to 106, where, when a capsid or capsid-type structure is formed

from the coat protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-type structure.

- 5 108. Use according to one of claims 81 to 107, where one strand of the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
- 10 109. Use according to one of claims 81 to 108, where the cell is a vertebrate cell or a human cell.
- 15 110. Use according to one of claims 81 to 109, where at least two dsRNAs which differ from each other are used, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.
- 20 111. Use according to claim 110, where one of the target genes is the PKR gene.
- 25 112. Use according to one of claims 81 to 111, where the medicament is injectable into the bloodstream or into the interstitium of the organism to undergo therapy.
- 30 113. Use according to one of claims 81 to 112, where the dsRNA is taken up into bacteria or microorganisms.
- 35 114. Use of a vector for coding at least one oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) formed by two separate RNA single strands for preparing a medicament or active ingredient for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region which is complementary to the target gene, characterized in that

the complementary region has less than 25 successive nucleotide pairs.

- 5 115. Use according to claim 114, where the target gene can be expressed in eukaryotic cells.
- 10 116. Use according to claim 114 or 115, where the target gene is selected from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.
- 15 117. Use according to one of claims 114 to 116, where the target gene can be expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
- 20 118. Use according to one of claims 114 to 117, where the target gene is part of a virus or viroid.
- 25 119. Use according to claim 118, where the virus is a virus or viroid which is pathogenic for humans.
- 30 120. Use according to claim 118, where the virus or viroid is a virus or viroid which is pathogenic for animals or phytopathogenic.
- 35 121. Use according to one of claims 114 to 120, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.
122. Use according to one of claims 114 to 121, where one strand of the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
123. Use according to one of claims 114 to 122, where the cell is a vertebrate cell or a human cell.
124. Use according to one of claims 114 to 123, where at least two dsRNAs which differ from each other

are used, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.

- 5 125. Use according to claim 125, where one of the target genes is the PKR gene.

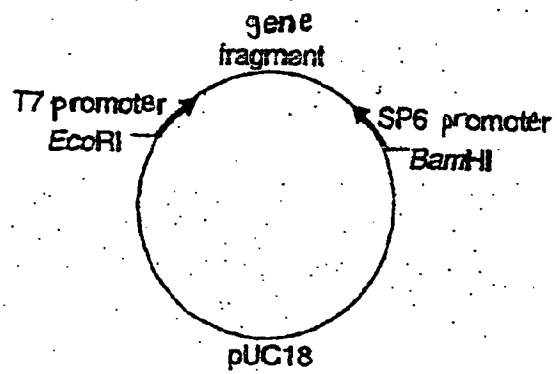


Fig. 1

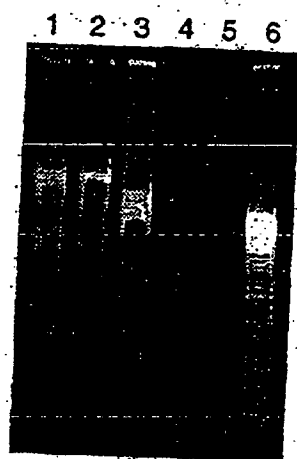


Fig. 2

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

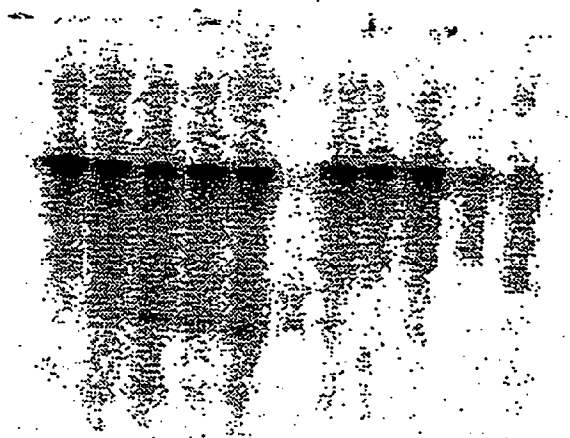


Fig. 3

Fig. 4 a

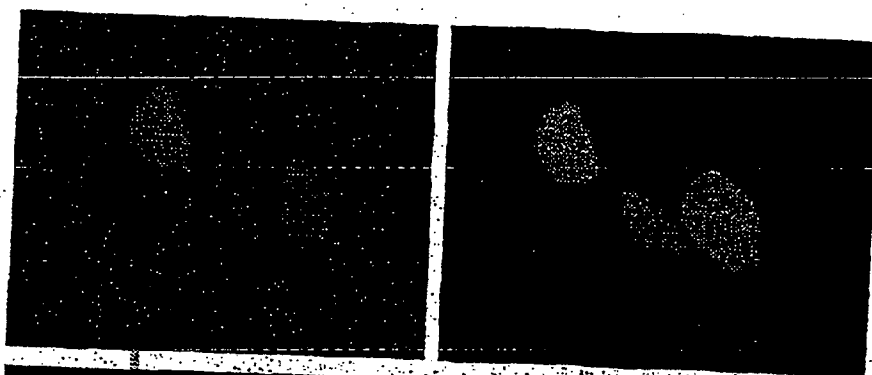


Fig. 4 b

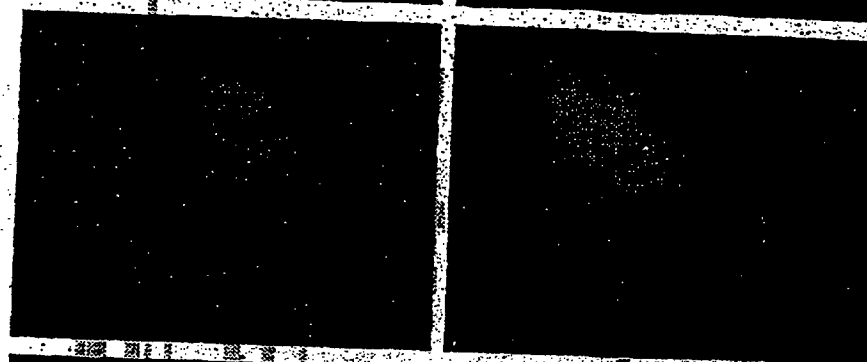


Fig. 4 c

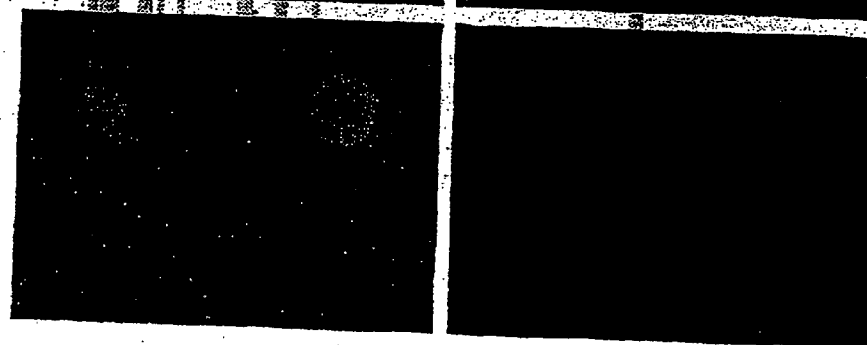


Fig. 4 d

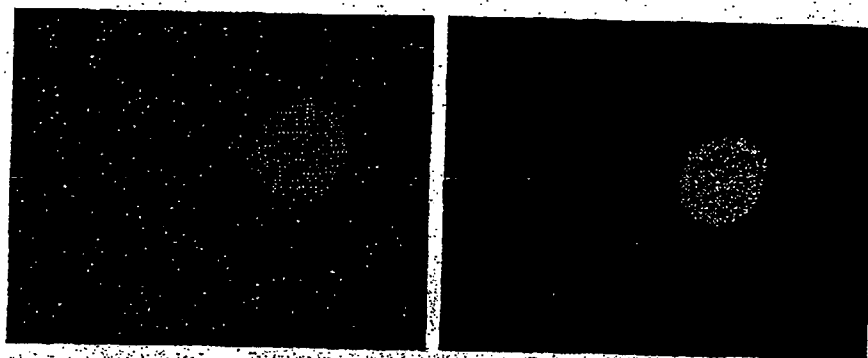
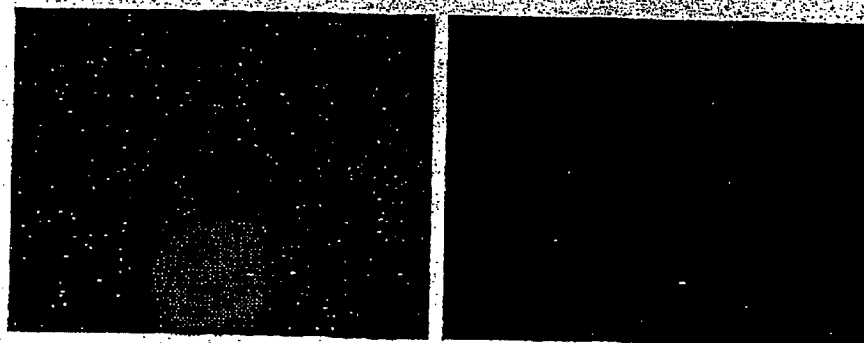
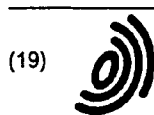


Fig. 4 e





Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) **EP 1 144 623 B1**

(12) **EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT**

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des
Hinweises auf die Patenterteilung:
28.08.2002 Patentblatt 2002/35

(51) Int Cl. 7: **C12N 15/11, A61K 31/713**

(86) Internationale Anmeldenummer:
PCT/DE00/00244

(21) Anmeldenummer: **00910510.7**

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:
WO 00/044895 (03.08.2000 Gazette 2000/31)

(22) Anmeldetag: **29.01.2000**

(54) **VERFAHREN UND MEDIKAMENT ZUR HEMMUNG DER EXPRESSION EINES VORGEGEBENEN GENS**

METHOD AND MEDICAMENT FOR INHIBITING THE EXPRESSION OF A DEFINED GENE

METHODE ET MEDICAMENT DESTINES A INHIBER L'EXPRESSION D'UN GENE DONNE

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**

(74) Vertreter: **Gassner, Wolfgang, Dr.**
Patentanwalt
Nägelsbachstrasse 49a
91052 Erlangen (DE)

(30) Priorität: **30.01.1999 DE 19903713**
24.11.1999 DE 19956568

(56) Entgegenhaltungen:
WO-A-92/19732 WO-A-98/05770
WO-A-99/32619

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
17.10.2001 Patentblatt 2001/42

(60) Teilanmeldung:
02003683.6 / 1 214 945

(73) Patentinhaber: **Ribopharma AG**
95440 Bayreuth (DE)

(72) Erfinder:
• **KREUTZER, Roland**
95466 Weidenberg (DE)
• **LIMMER, Stephan**
95447 Bayreuth (DE)

- **UHLMANN E ET AL: "ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES: A NEW THERAPEUTIC PRINCIPLE" CHEMICAL REVIEWS, US, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, EASTON, Bd. 90, Nr. 4, 1. Juni 1990 (1990-06-01), Seiten 543-584, XP000141412 ISSN: 0009-2665**
- **MADHUR K. ET AL.: "Antisense RNA : function and fate of duplex RNA in cells of higher eukaryotes." MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS, Bd. 62, Dezember 1998 (1998-12), Seiten 1415-1434, XP000909741**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

EP 1 144 623 B1

Beschreibung

- [0001] Die Erfindung betrifft Verfahren nach dem Oberbegriff des Anspruchs 1. Sie betrifft ferner ein Medikament nach dem Oberbegriff des Anspruchs 32, einen Wirkstoff nach dem Oberbegriff des Anspruchs 63 sowie Verwendungen nach den Oberbegriffen der Ansprüche 81 und 114.
- [0002] Ein solches Verfahren ist aus der nachveröffentlichten WO 99/32619 bekannt. Das bekannte Verfahren zielt auf die Hemmung der Expression von Genen in Zellen von Invertebraten ab. Dazu ist es erforderlich, daß das doppelsträngige Oligoribonukleotid eine zum Zielgen identische Sequenz mit einer Länge von mindestens 25 Basen aufweist. Zur Erzielung einer effizienten Hemmung ist eine Länge der identischen Sequenz von 300 bis 1000 Basenpaare erforderlich. Der Herstellungsaufwand eines solchen Oligoribonukleotids ist hoch.
- [0003] Die DE 196 31 919 C2 beschreibt eine Anti-Sinn-RNA mit besonderen Sekundärstrukturen, wobei die Anti-Sinn-RNA in Form eines sie kodierenden Vektors vorliegt. Bei der Anti-Sinn-BNA handelt es sich um ein RNA-Molekül, das komplementär zu Bereichen der mRNA ist. Durch Bindung an diese Bereiche wird eine Hemmung der Genexpression bewirkt. Diese Hemmung kann insbesondere zur Diagnose und/oder Therapie von Erkrankungen, z.B. Tumorerkrankungen oder viralen Infektionen, eingesetzt werden. - Die Anti-Sinn-RNA muß nachteiligerweise in einer Menge in die Zelle eingebracht werden, die mindestens genauso groß wie die Menge der mRNA ist. Die Wirksamkeit der bekannten Anti-Sinn-Verfahren ist nicht besonders hoch.
- [0004] Aus der US 5,712,257 ist ein Medikament bekannt, das fehlgepaarte doppelsträngige RNA (dsRNA)-und biologisch aktive fehlgepaarte Bruchstücke von dsRNA in Form eines ternären Komplexes mit einem oberflächenaktiven Mittel enthält. Die dabei verwendete dsRNA besteht aus synthetisch hergestellten Nukleinsäureeinzelsträngen ohne definierte Basensequenz. Die Einzelstränge gehen nicht-reguläre, sogenannte "Nicht-Watson-Crick"-Basenpaarungen miteinander ein, so daß fehlgepaarte Doppelstränge gebildet werden. Die bekannte dsRNA dient zur Hemmung der Vermehrung von Retroviren, wie HIV. Die Vermehrung des Virus kann gehemmt werden, wenn nicht-sequenzspezifische dsRNA in die Zellen eingebracht wird. Es kommt dabei zu einer Induktion von Interferon, wodurch die Virusvermehrung gehemmt werden soll. Der hemmende Effekt bzw. die Wirksamkeit dieses Verfahrens ist gering.
- [0005] Aus Fire, A. et al, NATURE, Vol. 391, pp. 806 ist es bekannt, daß dsRNA, deren einer Strang abschnittsweise komplementär zu einem zu hemmenden Gen eines Fadenwurms ist, die Expression dieses Gens mit einer hohen Wirksamkeit hemmt. Es wird die Auffassung vertreten, daß die besondere Wirksamkeit der verwendeten dsRNA in Zellen des Fadenwurms nicht auf dem Anti-Sinn-Prinzip beruht, sondern möglicherweise auf katalytische Eigenschaften der dsRNA bzw. durch sie induzierte Enzyme zurückzuführen ist. - Über die Wirksamkeit spezifischer dsRNA in bezug auf die Hemmung der Genexpression, insbesondere in Säugerzellen und humanen Zellen, ist in diesem Artikel nichts ausgesagt.
- [0006] Die WO 92/19732 betrifft Anti-Sinn-Oligonukleotide und deren Verwendung. Die einzelsträngigen Oligonukleotide sind zum Schutz gegen enzymatischen Abbau durch Exonukleasen rückgefaltet oder topologisch geschlossen. Ihre Wirkung beruht insbesondere auf der Blockade der Expression von Zielgenen durch Tripel-Helixbindung.
- [0007] Die WO 98/05770 betrifft eine Anti-Sinn-RNA. Die Anti-Sinn-RNA weist einen doppelsträngigen Bereich auf. Dieser Bereich ist jedoch nicht komplementär zum Zielgen. Beim doppelsträngigen Bereich handelt es sich um eine durch eine Poly-GCGC ... -sequenz erzeugte selbstkomplementäre Faltung, welche der Stabilisierung des Moleküls dient.
- [0008] Ulmann et al., 2377 Chemical Review, 90 (1990) June, No. 4, Washington DC, US gibt einen Überblick über die Wirkungsweise von Anti-Sinn-Oligonukleotiden.
- [0009] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu beseitigen. Es soll insbesondere ein möglichst effizientes Verfahren, Medikament bzw. Wirkstoff und eine möglichst effiziente Verwendung zur Herstellung eines Medikaments bzw. Wirkstoffs angegeben werden, mit dem/der eine besonders wirksame Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens bewirkbar ist.
- [0010] Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 32, 63, 81 und 114 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Ansprüchen 2 bis 31, 33 bis 62, 82 bis 113 und 115 bis 125.
- [0011] Die Aufgabe wird gelöst u.a. durch die Merkmale Anspruchs 1.
- [0012] Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß bereits bei einer Länge des komplementären Bereichs von weniger als 25 aufeinanderfolgenden Nukleotidpaaren eine wirksame Hemmung der Expression des Zielgens erreicht werden kann. Entsprechende Oligoribonukleotide können mit geringerem Herstellungsaufwand bereitgestellt werden.
- [0013] Insbesondere dsRNA mit einer Länge von mehr als 50 Nukleotidpaaren induziert in Säugerzellen und humanen Zellen bestimmte zelluläre Mechanismen, z.B. die dsRNA-abhängige Proteinkinase oder das 2-5A-System. Das führt zum Verschwinden des durch die eine definierte Sequenz aufweisende dsRNA vermittelten Interferenzeffektes. Dadurch wird die Proteinbiosynthese in der Zelle blockiert. Insbesondere dieser Nachteil wird durch die vorliegende Erfindung beseitigt.
- [0014] Weiterhin ist die Aufnahme von dsRNA mit kurzer Kettenlänge in die Zelle bzw. in den Zellkern gegenüber längererkettigen dsRNAs deutlich erleichtert.

[0015] Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, daß die dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt. Die dsRNA kann gleichfalls in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen sein. - Die vorgenannten Merkmale ermöglichen ein Einschleusen der dsRNA in vorgegebene Zielzellen.

[0016] Das zu hemmende Gen wird zweckmäßigerweise in eukaryontischen Zellen exprimiert. Das Zielgen kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Priongen. Es kann auch in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert werden. Es kann Bestandteil eines, vorzugsweise humanpathogenen, Virus oder Viroids sein. - Das vorgeschlagene Verfahren ermöglicht die Herstellung von Mitteln zur Therapie genetisch gesteuerter Krankheiten, z.B. Krebs, viraler Erkrankungen oder Morbus Alzheimer.

[0017] Das Virus oder Viroid kann auch ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid sein. In diesem Fall erlaubt das erfindungsgemäße Verfahren auch die Bereitstellung von Mitteln zur Behandlung von Tier- oder Pflanzenkrankheiten.

[0018] Nach einem weiteren Ausgestaltungsmerkmal ist die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet. Die Enden der dsRNA können modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken. Eine Dissoziation tritt insbesondere bei Verwendung niedriger Konzentrationen oder kurzer Kettenlängen auf. Zur besonders wirksamen Hemmung der Dissoziation kann der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht werden. - Eine erfindungsgemäße dsRNA, deren Dissoziation vermindert ist, weist eine höhere Stabilität gegen enzymatischen und chemischen Abbau in der Zelle bzw. im Organismus auf.

[0019] Die chemische Verknüpfung wird zweckmäßigerweise durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waalsoder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet. Sie kann nach einem besonders vorteilhaften Ausgestaltungsmerkmal an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Ende/n hergestellt werden.

[0020] Es hat sich weiter als vorteilhaft erwiesen, daß die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propan-diol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind. Die chemische Verknüpfung kann auch durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzte Purinanaloge gebildet werden. Von Vorteil ist es ferner, daß die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur eingeführte Azabenzoleinheiten gebildet wird. Sie kann außerdem durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Nukleotiden benutzte verzweigte Nukleotidanaloge gebildet werden.

[0021] Es hat sich als zweckmäßig erwiesen, daß zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxybenzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen. Ferner kann die chemische Verknüpfung durch an den Enden des doppelsträngigen Bereichs angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet werden. Vorzugsweise wird die chemische Verknüpfung an den Enden des doppelsträngigen Bereichs durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt.

[0022] Die chemische Verknüpfung kann zweckmäßigerweise durch ultraviolettes Licht induziert werden.

[0023] Die Nukleotide der dsRNA können modifiziert sein. Dies wirkt einer Aktivierung einer von doppelsträngiger RNA abhängigen Proteinkinase, PKR, in der Zelle entgegen. Vorteilhafterweise ist mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA in der doppelsträngigen Struktur durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt. Mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang der doppelsträngigen Struktur kann auch ein sogenanntes "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring sein. Vorteilhafterweise sind mehrere Nukleotide "locked nucleotides".

[0024] Nach einer weiteren besonders vorteilhaften Ausgestaltung ist vorgesehen, daß die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird. Das Hüllprotein kann vom Polyomavirus abgeleitet sein. Es kann das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthalten. Die Verwendung derartiger Hüllproteine ist z.B. aus der DE 196 18 797 A1 bekannt. - Die vorgenannten Merkmale erleichtert wesentlich das Einführen der dsRNA in die Zelle.

[0025] Vorzugsweise ist bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt. Das gebildete Konstrukt ist besonders stabil.

[0026] Die dsRNA kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär sein. - Die Zelle kann eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle sein.

[0027] Es können mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs in die Zelle eingeführt werden, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens zwei verschiedenen Zielgenen ist. Dadurch ist es möglich, gleichzeitig die Expression mindestens zwei verschiedener Zielgene zu hemmen. Um die Expression einer von doppelsträngiger RNA abhängigen Proteinkinase, PKR, in der-Zelle zu unterdrücken, ist eines der Zielgene vorteilhafterweise das PKR-Gen. Dadurch kann die PKR-Aktivität in der Zelle wirksam unterdrückt werden.

[0028] Nach Maßgabe der Erfindung wird die Aufgabe ferner durch ein Medikament mit den Merkmalen der Ansprüche 32 bzw. 63 gelöst. - Es hat sich überraschend gezeigt, daß eine solche dsRNA sich als Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens in Säugerzellen bzw. in einem pflanzenpathogenen Virus oder Viroids eignet. Die Hemmung wird im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide bereits bei Konzentrationen bewirkt, die um mindestens eine Größenordnung niedriger sind. Das erfindungsgemäße Medikament ist hoch wirksam. Es sind geringere Nebenwirkungen zu erwarten.

[0029] Nach weiterer Maßgabe der Erfindung wird die Aufgabe durch eine Verwendung eines Oligoribonukleotids mit den Merkmalen des des Anspruchs 81. - Überraschenderweise eignet sich eine solche dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens. Bei einer Verwendung von dsRNA wird die Hemmung im Vergleich zur Verwendung einzelsträngiger Oligoribonukleotide schon bei um eine Größenordnung geringeren Konzentrationen bewirkt. Die erfindungsgemäße Verwendung ermöglicht also die Herstellung besonders wirksamer Medikamente.

[0030] Nach weiterer Maßgabe der Erfindung wird die Aufgabe gelöst durch die Verwendung eines Vektors mit den Merkmalen des Anspruchs 114. - Die Verwendung eines solchen Vektors ermöglicht eine besonders wirksame Gen-therapie.

[0031] Hinsichtlich vorteilhafter Ausgestaltungen des Medikaments und der Verwendung wird auf die Beschreibung der vorangegangenen Merkmale verwiesen.

[0032] Nachfolgend werden anhand der Figuren Ausführungsbeispiele der Erfindung näher erläutert. Es zeigen:

- Fig. 1 die schematische Darstellung eines Plasmids für die *in vitro*-Transkription mit T7- und SP6-Polymerase,
- Fig. 2 RNA nach Elektrophorese auf einem 8%igen Polyacrylamidgel und Ethidiumbromidfärbung,
- Fig. 3 eine Darstellung radioaktiver RNA-Transkripte nach Elektrophorese auf einem 8%igen Polyacrylamidgel mit 7 M Harnstoff mittels eines "Instant Imagers" und
- Fig. 4 a - e Texas-Rot- und YFP-Fluoreszenz in murinen Fibroblasten.

Ausführungsbeispiel 1:

[0033] Die Inhibition der Transkription wurde durch sequenzhomologe dsRNA in einem *in vitro*-Transkriptionssystem mit einem Kernextrakt aus humanen HeLa-Zellen nachgewiesen. Die DNA-Matrize für diesen Versuch war das mittels *Bam*HI linearisierte Plasmid pCMV1200.

Herstellung der Matrizenplasmide:

[0034] Zur Verwendung bei der enzymatischen Synthese der dsRNA wurde das in Fig. 1 dargestellte Plasmid konstruiert. Dazu wurde zunächst eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der "positive control DNA" des HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskits der Firma Promega, Madison, USA als DNA-Matrize durchgeführt. Einer der verwendeten Primer enthielt die Sequenz einer *Eco*RI-Schnittstelle und des T7-RNA-Polymerase-Promotors gemäß Sequenzprotokoll Nr. 1. Der andere Primer enthielt die Sequenz einer *Bam*HI-Schnittstelle und des SP6-RNA-Polymerase-Promotors gemäß Sequenzprotokoll Nr. 2. Darüber hinaus wiesen beide Primer an ihren 3'-Enden identische bzw. komplementäre Bereiche zur DNA-Matrize auf. Die PCR wurde mittels des "Taq PCR Core Kits" der Firma Qiagen, Hilden, Deutschland nach Herstellerangaben durchgeführt. In einem Volumen von 100 µl wurden 1,5 mM MgCl₂, je 200 µM dNTP, je 0,5 µM Primer, 2,5 U Taq-DNA-Polymerase und etwa 100 ng "positive control DNA" als Matrize in PCR-Puffer eingesetzt. Nach der anfänglichen Denaturierung der Matrizen-DNA durch Erhitzen auf 94°C für 5 Minuten erfolgte die Amplifikation in 30 Zyklen von je 60 Sekunden Denaturierung bei 94°C, 60 Sekunden Annealing bei 5°C unterhalb der berechneten Schmelztemperatur der Primer und 1,5 - 2 Minuten Polymerisation bei 72°C. Nach einer Schlußpolymerisation von 5 Minuten bei 72°C wurden 5 µl des Reaktionsansatzes durch Agarosegelelektrophorese analysiert. Die Länge des so amplifizierten DNA-Fragmentes betrug 400 Basenpaare, wobei 340 Basenpaare der "positive control DNA" entsprachen. Das PCR-Produkt wurde aufgereinigt, mit *Eco*RI und *Bam*HI hydrolysiert und nach erneuter Aufreinigung zur Ligation mit einem ebenfalls durch *Eco*RI und *Bam*HI hydrolysierten pUC18 Vektor eingesetzt. Es erfolgte Transformation von *E. coli* XL1-blue. Das erhaltene Plasmid (pCMV5) trägt ein DNA-Fragment, das am 5'-Ende von dem T7- und am 3'-Ende von dem SP6-Promotor flankiert wird. Durch Linearisierung des Plasmids mit *Bam*HI kann es *in vitro* mit der T7-RNA-Polymerase zur *run-off*-Transkription einer 340 Nukleotide langen, in Sequenzprotokoll Nr. 3 dargestellten, einzelsträngigen RNA eingesetzt werden. Wird das Plasmid mit *Eco*RI linearisiert, kann es zur *run-off*-Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase eingesetzt werden, wobei der komplementäre Strang entsteht. Entsprechend dem zuvor dargestellten Verfahren wurde auch eine 23 Nukleotide längere RNA synthetisiert.

EP 1 144 623 B1

Dazu wurde eine in Sequenzprotokoll Nr. 4 dargestellte DNA über die *EcoRI* und *BamHI*-Schnittstellen mit dem pUC18 Vektor ligiert.

[0035] Als DNA-Matrize für die *in vitro*-Transkription mit HeLa-Kernextrakt wurde das Plasmid pCMV1200 konstruiert. Dazu wurde ein 1191 bp großes *EcoRI*/*BamHI*-Fragment der im HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskit enthaltenen Positivkontroll-DNA mittels PCR amplifiziert. Das amplifizierte Fragment umfaßt den 828 bp großen "unmittelbar frühen" CMV-Promotor und ein 363 bp großes transkribierbares DNA-Fragment. Das PCR-Produkt wurde über "T-Überhang"-Ligation mit dem Vektor pGEM-T ligiert. Am 5'-Ende des Fragments ist eine *BamHI*-Schnittstelle. Das Plasmid wurde durch Hydrolyse mit *BamHI* linearisiert und als Matrize zur run-off-Transkription eingesetzt.

In vitro-Transkription der komplementären Einzelstränge:

[0036] pCMV5-Plasmid-DNA wurde mit *EcoRI* bzw. *BamHI* linearisiert. Sie wurde als DNA-Matrize für eine *in vitro*-Transkription der komplementären RNA-Einzelstränge mit SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase verwendet. Dazu wurde das "Riboprobe *in vitro* Transcription" System der Firma Promega, Madison, USA eingesetzt. Nach Herstellerangaben wurden 2 µg linearisierte Plasmid-DNA in 100 µl Transkriptionspuffer und 40 U T7- oder SP6-RNA-Polymerase 5 - 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNA-Matrize durch Zugabe von 2,5 µl RNase-freier DNase RQ1 und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C abgebaut. Der Transkriptionsansatz wurde mit H₂O auf 300 µl aufgefüllt und durch Phenolextraktion gereinigt. Die RNA wurde durch Zugabe von 150 µl 7 M Ammoniumacetat und 1125 µl Ethanol gefällt und bis zur Hybridisierung bei -65°C aufbewahrt.

Herstellung der RNA-Doppelstränge:

[0037] Zur Hybridisierung wurden 500 µl der in Ethanol aufbewahrten und gefällten einzelsträngigen RNA abzentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde getrocknet und in 30 µl PIPES-Puffer, pH 6,4 in Gegenwart von 80 % Formamid, 400 mM NaCl und 1 mM EDTA aufgenommen. Jeweils 15 µl der komplementären Einzelstränge wurden zusammengegeben und für 10 Minuten auf 85°C erhitzt. Anschließend wurden die Ansätze bei 50°C über Nacht inkubiert und auf Raumtemperatur abgekühlt.

[0038] Bei der Hybridisierung wurden nur annähernd äquimolare Mengen der beiden Einzelstränge eingesetzt. Dadurch enthielten die dsRNA-Präparationen einzelsträngige RNA (ssRNA) als Kontamination. Um diese ssRNA-Kontaminationen zu entfernen, wurden die Ansätze nach der Hybridisierung mit den einzelstrangspezifischen Ribonukleasen RNase A aus Rinderpankreas und RNase T1 aus *Aspergillus oryzae* behandelt. RNase A ist eine für Pyrimidine spezifische Endoribonuklease. RNase T1 ist eine Endoribonuklease, die bevorzugt auf der 3'-Seite von Guanosinen schneidet. dsRNA ist kein Substrat für diese Ribonukleasen. Für die RNase-Behandlung wurde zu den Ansätzen in 300 µl Tris, pH 7,4, 300 mM NaCl und 5 mM EDTA 1,2 µl RNaseA in einer Konzentration von 10 mg/ml und 2 µl RNaseT1 in einer Konzentration von 290 µg/ml zugegeben. Die Ansätze wurden 1,5 Stunden bei 30°C inkubiert. Danach wurden die RNasen durch Zugabe von 5 µl Proteinase K in einer Konzentration von 20 mg/ml sowie 10 µl 20%iges SDS und Inkubation für 30 Minuten bei 37°C denaturiert. Die dsRNA wurde durch Phenol-Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Um die Vollständigkeit des RNase-Verdaus überprüfen zu können, wurden zwei Kontrollansätze mit ssRNA analog zu den Hybridisierungsansätzen behandelt.

[0039] Das getrocknete Pellet wurde in 15 µl TE-Puffer, pH 6,5 aufgenommen und auf einem 8%igen Gel einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen. Das Acrylamidgel wurde anschließend in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt und in einem Wasserbad gespült. Fig. 2 zeigt die auf einem UV-Transilluminator sichtbar gemachte RNA. Die auf Spur 1 aufgetragene *sense*- und die auf Spur 2 aufgetragene *antisense*-RNA zeigten unter den gewählten Bedingungen ein anderes Laufverhalten als die auf Spur 3 aufgetragene dsRNA des Hybridisierungsansatzes. Die auf den Spuren 4 bzw. 5 aufgetragene RNase-behandelte *sense*- bzw. *antisense*-RNA erzeugte keine sichtbare Bande. Dies zeigt, daß die einzelsträngigen RNAs vollständig abgebaut wurden. Die auf Spur 6 aufgetragene RNase-behandelte dsRNA des Hybridisierungsansatzes ist resistent gegenüber der RNase-Behandlung. Die im nativen Gel im Vergleich zu der auf Spur 3 aufgetragenen dsRNA schneller wandernde Bande resultiert aus dsRNA, die frei von ssRNA ist. Neben der dominierenden Hauptbande treten nach der RNase-Behandlung schwächere, schneller wandernde Banden auf.

In vitro-Transkriptions-Test mit menschlichem Zellkernextrakt:

[0040] Unter Verwendung des HeLaScribe® Nuclear Extract *in vitro* Transkriptionskits der Firma Promega, Madison, USA wurde die Transkriptionseffizienz des oben angegebenen, im Plasmid pCMV1200 enthaltenen, zur "positive control DNA" homologen DNA-Fragments in Gegenwart der sequenzhomologen dsRNA (dsRNA-CMV5) bestimmt. Außerdem wurde der Einfluß der nichtsequenzhomologen, dem "Gelb fluoreszierenden Protein" (YFP)-Gen entsprechenden dsRNA (dsRNA-YFP) untersucht. Diese dsRNA war analog zur sequenzhomologen dsRNA hergestellt worden.

Die Sequenz eines Stranges dieser dsRNA ist Sequenzprotokoll Nr. 5 zu entnehmen. Als Matrize für die *run-off*-Transkription diente das Plasmid pCMV1200. Es trägt den "unmittelbar frühen" Promotor des Cytomegalievirus, der von der eukaryotischen RNA-Polymerase II erkannt wird, und ein transkribierbares DNA-Fragment. Die Transkription erfolgte mittels des HeLa-Kernextrakts, der alle notwendigen Proteine für eine Transkription enthält. Durch Zugabe von [32 P]rGTP zum Transkriptionsansatz wurde radioaktiv markiertes Transkript erhalten. Das verwendete [32 P]rGTP hatte eine spezifische Aktivität von 400 Ci/mmol, 10 mCi/ml. Pro Ansatz wurden 3 mM MgCl₂, je 400 μ M rATP, rCTP, rUTP, 16 μ M rGTP, 0,4 μ M [32 P]rGTP und je nach Versuch 1 fmol linearisierte Plasmid-DNA und verschiedene Mengen an dsRNA in Transkriptionspuffer eingesetzt. Jeder Ansatz wurde mit H₂O auf ein Volumen von 8,5 μ l aufgefüllt. Die Ansätze wurden vorsichtig gemischt. Zum Starten der Transkription wurden 4 U HeLa-Kernextrakt in einem Volumen von 4 μ l zugegeben und für 60 Minuten bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 87,5 μ l auf 30°C erwärmten Stopp-Mix beendet. Zur Entfernung der Proteine wurden die Ansätze mit 100 μ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v), gesättigt mit TE-Puffer, pH 5,0, versetzt und 1 Minute kräftig gemischt. Zur Phasentrennung wurde etwa 1 Minute bei 12000 rpm zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zu jedem Ansatz wurden 250 μ l Ethanol zugegeben. Die Ansätze wurden gut gemischt und für mindestens 15 Minuten auf Trockeneis/Methanol inkubiert. Zur Präzipitation der RNA wurden die Ansätze 20 Minuten bei 12000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde 15 Minuten im Vakuum getrocknet und in 10 μ l H₂O resuspendiert. Zu jedem Ansatz wurden 10 μ l denaturierender Probenpuffer zugegeben. Die Trennung des freien GTP vom entstandenen Transkript erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf einem 8%igen Gel mit 7 M Harnstoff. Die bei der Transkription mit HeLa-Kernextrakt gebildeten RNA-Transkripte in denaturierendem Probenpuffer wurden für 10 Minuten auf 90°C erhitzt und 10 μ l davon sofort in die frisch gespülten Probentassen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA. Die Menge der bei der Transkription gebildeten radioaktiven ssRNA wurde nach der Elektrophorese mit Hilfe eines *Instant Imager* analysiert.

[0041] Fig. 3 zeigt die mittels des *Instant Imagers* dargestellte radioaktive RNA aus einem repräsentativen Tests. Es wurden aus folgenden Transkriptionsansätzen gewonnene Proben aufgetragen:

- Spur 1: ohne Matrizen-DNA, ohne dsRNA;
- Spur 2: 50 ng Matrizen-DNA, ohne dsRNA;
- Spur 3: 50 ng Matrizen-DNA, 0,5 μ g dsRNA-YFP;
- Spur 4: 50 ng Matrizen-DNA, 1,5 μ g dsRNA-YFP;
- Spur 5: 50 ng Matrizen-DNA, 3 μ g dsRNA-YFP;
- Spur 6: 50 ng Matrizen-DNA, 5 μ g dsRNA-YFP;
- Spur 7: ohne Matrizen-DNA, 1,5 dsRNA-YFP;
- Spur 8: 50 ng Matrizen-DNA, ohne dsRNA;
- Spur 9: 50 ng Matrizen-DNA, 0,5 μ g dsRNA-CMV5;
- Spur 10: 50 ng Matrizen-DNA, 1,5 μ g dsRNA-CMV5;
- Spur 11: 50 ng Matrizen-DNA, 3 μ g dsRNA-CMV5;
- Spur 12: 50 ng Matrizen-DNA, 5 μ g dsRNA-CMV5;

[0042] Es zeigte sich eine deutliche Verringerung der Menge an Transkript in Gegenwart von sequenzhomologer dsRNA im Vergleich zum Kontrollansatz ohne dsRNA sowie auch zu den Ansätzen mit nicht-sequenzhomologer dsRNA-YFP. Die Positivkontrolle in Spur 2 zeigt, daß bei der *in vitro*-Transkription mit HeLa-Kernextrakt radioaktives Transkript gebildet wurde. Der Ansatz dient zum Vergleich mit den Transkriptionsansätzen, die in Gegenwart von dsRNA inkubiert worden waren. Die Spuren 3 bis 6 zeigen, daß die Zugabe von nicht-sequenzspezifischer dsRNA-YFP keinen Einfluß auf die Menge des gebildeten Transkripts hat. Die Spuren 9 bis 12 zeigen, daß die Zugabe einer zwischen 1,5 und 3 μ g liegenden Menge sequenzspezifischer dsRNA-CMV5 zu einer Abnahme der gebildeten Transkript-Menge führt. Um auszuschließen, daß die beobachteten Effekte nicht auf der dsRNA, sondern auf einer möglicherweise bei der Herstellung der dsRNA unabsichtlich mitgeführten Kontamination beruhen, wurde eine weitere Kontrolle durchgeführt. Einzelstrang-RNA wurde wie oben beschrieben transkribiert und anschließend der RNase-Behandlung unterzogen. Mittels nativer Polyacrylamidgelelektrophorese konnte gezeigt werden, daß die ssRNA vollständig abgebaut worden war. Dieser Ansatz wurde wie die Hybridisierungsansätze einer Phenolextraktion und einer Ethanol-fällung unterzogen und anschließend in TE-Puffer aufgenommen. Auf diese Weise wurde eine Probe erhalten, die keine RNA enthielt, aber mit den gleichen Enzymen und Puffern behandelt worden war wie die dsRNA. Spur 8 zeigt, daß der Zusatz dieser Probe keinen Einfluß auf die Transkription hatte. Die Abnahme des Transkripts bei Zugabe sequenzspezifischer dsRNA kann deshalb eindeutig der dsRNA selbst zugeschrieben werden. Die Reduzierung der Transkript-Menge eines Gens in Gegenwart von dsRNA bei einem menschlichen Transkriptionssystem zeigt eine Hemmung der Expression des entsprechenden Gens an. Dieser Effekt ist auf einen neuartigen, durch die dsRNA bedingten Mechanismus zurückzuführen.

Ausführungsbeispiel 2:

[0043] Als Testsystem für diese *in vivo*-Experimente diente die murine Fibroblasten-Zelllinie NIH3T3, ATCC CRL-1658. Mit Hilfe der Mikroinjektion wurde das YFP-Gen in die Zellkerne eingebracht. Die Expression des YFP wurde unter dem Einfluß gleichzeitig mittransfizierter sequenzhomologer dsRNA untersucht. Diese dsRNA-YFP ist über eine Länge von 315 bp zum 5'-Bereich des YFP-Gens homolog. Die Nukleotidsequenz eines Strangs der dsRNA-YFP ist in Sequenzprotokoll Nr. 5 wiedergegeben. Die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop erfolgte 3 Stunden nach Injektion anhand der grün-gelben Fluoreszenz des gebildeten YFP.

Konstruktion des Matrizenplasmids und Herstellung der dsRNA:

[0044] Als Matrize für die Herstellung der YFP-dsRNA mittels T7- und SP6-*in vitro*-Transkription wurde ein Plasmid nach dem gleichen Prinzip wie im Ausführungsbeispiel 1 beschrieben konstruiert. Das gewünschte Genfragment wurde unter Verwendung des Primers *Eco_T7_YFP* gemäß Sequenzprotokoll Nr. 6 und *Bam_SP6_YFP* gemäß Sequenzprotokoll Nr. 7 mittels PCR amplifiziert und analog zu der obigen Beschreibung zur Herstellung der dsRNA verwendet. Die erhaltene dsRNA-YFP ist identisch mit der in Ausführungsbeispiel 1 als nicht-sequenzspezifische Kontrolle verwendeten dsRNA.

[0045] Es wurde eine am 3'-Ende der RNA gemäß Sequenzprotokoll Nr. 8 über eine C18-Linkergruppe chemisch mit dem 5'-Ende der komplementären RNA verknüpfte dsRNA (L-dsRNA) hergestellt. Dazu wurden mit Disulfid-Brücken modifizierte Synthone verwendet. Das 3'-terminale Synthon ist über den 3'-Kohlenstoff mit einer aliphatischen Linker-Gruppe über eine Disulfidbrücke an den festen Träger gebunden. Bei dem zum 3'-terminalen Synthon des einen Oligoribonukleotids komplementären 5'-terminalen Synthon des komplementären Oligoribonukleotids ist die 5'-Tritylschutzgruppe über einen weiteren aliphatischen Linker und eine Disulfidbrücke gebunden. Nach Synthese der beiden Einzelstränge, Entfernen der Schutzgruppen und Hybridisierung der komplementären Oligoribonukleotide gelangen die entstehenden Thiolgruppen in räumliche Nachbarschaft zueinander. Durch Oxidation werden die Einzelstränge über ihre aliphatischen Linker und eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft. Anschließend erfolgt Reinigung mit Hilfe der HPLC.

Vorbereitung der Zellkulturen:

[0046] Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glucose, 10 % fötalem Rinderserum unter 7,5 % CO₂-Atmosphäre bei 37°C in Kulturschalen inkubiert und vor Erreichen der Konfluenz passagiert. Das Ablösen der Zellen erfolgte mit Trypsin/EDTA. Zur Vorbereitung der Mikroinjektion wurden die Zellen in Petrischalen überführt und bis zu Bildung von Mikrokolonien weiter inkubiert.

Mikroinjektion:

[0047] Die Kulturschalen wurde zur Mikroinjektion für ca. 10 Minuten aus dem Inkubator genommen. Es wurde in ca. 50 Zellkerne pro Ansatz innerhalb eines markierten Bereichs unter Verwendung des Mikroinjektionssystems AIS der Firma Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland einzeln injiziert. Anschließend wurden die Zellen weitere drei Stunden inkubiert. Für die Mikroinjektion wurden Borosilikat-Glaskapillaren der Firma Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland mit einem Spitzendurchmesser unter 0,5 µm vorbereitet. Die Mikroinjektion wurde mit einem Mikromanipulator der Firma Narishige Scientific Instrument Lab., Tokyo, Japan durchgeführt. Die Injektionsdauer betrug 0,8 Sekunden, der Druck ca. 100 hPa. Für die Transfektion wurde das Plasmid pCDNA-YFP verwendet, das ein ca. 800 bp großes *Bam*HI/*Eco*RI-Fragment mit dem Gen des YFP im Vektor pcDNA3 enthält. Die in die Zellkerne injizierten Proben enthielten 0,01 µg/µl pCDNA-YFP sowie an Dextran-70000 gekoppeltes Texas-Rot in 14 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM KPO₄, pH 7,5. Zusätzlich wurden ca. 100 pl RNA mit einer Konzentration von 1 µM, bzw. 375 µM im Fall der L-dsRNA, zugegeben.

[0048] Die Zellen wurden bei Anregung mit Licht der Anregungswellenlänge von Texas-Rot, 568 nm, bzw. von YFP, 488 nm, mittels eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Einzelne Zellen wurden mittels einer digitalen Kamera dokumentiert. Die Figuren 4 a - e zeigen das Ergebnis für NIH3T3-Zellen. Bei den in Fig. 4 a gezeigten Zellen ist sense-YFP-ssRNA, in Fig. 4 b antisense-YFP-ssRNA, in Fig. 4 c dsRNA-YFP, in Fig. 4 d keine RNA und in Fig. 4 e L-dsRNA injiziert worden.

[0049] Das jeweils linke Feld zeigt die Fluoreszenz von Zellen, die mit 568 nm angeregt wurden. Rechts ist die Fluoreszenz derselben Zellen bei Anregung mit 488 nm zu sehen. Die Texas-Rot-Fluoreszenz aller dargestellten Zellen zeigt, daß die Injektionslösung erfolgreich in die Zellkerne appliziert wurde und getroffene Zellen nach drei Stunden noch lebendig waren. Abgestorbene Zellen zeigten keine Texas-Rot-Fluoreszenz mehr.

[0050] Die jeweils rechten Felder der Figuren 4 a und 4 b zeigen, daß die Expression des YFP bei Injektion der einzelsträngigen RNA in die Zellkerne nicht sichtbar inhibiert wurde. Das rechte Feld der Fig. 4 c zeigt Zellen, deren

YFP-Fluoreszenz nach Injektion von dsRNA-YFP nicht mehr nachweisbar war. Fig. 4 d zeigt als Kontrolle Zellen, in die keine RNA injiziert worden war. Die in Fig. 4 e dargestellte Zelle zeigt durch die Injektion der L-dsRNA, die zum YFP-Gen sequenzhomologe Bereiche aufweist, eine nicht mehr nachweisbare YFP-Fluoreszenz. Dieses Ergebnis belegt, daß auch kürzere dsRNAs zur spezifischen Inhibition der Genexpression bei Säugern verwendet werden können, wenn die Doppelstränge durch chemische Verknüpfung der Einzelstränge stabilisiert werden.

Literatur:

[0051]

10

Asanuma, H., Ito, T., Yoshida, T., Liang, X. & Komiyama, M. (1999). Photoregulation der Bildung und Dissoziation eines DNA-Duplexes durch *cis-trans*-Isomerisierung einer Azobenzoleinheit. *Angew. Chem.* **111**, 2547-2549.

15

Azhayeva, E., Azhayev, A., Auriola, S., Tengvall, U., Urtti, A. & Lönnberg, H. (1997). Inhibitory properties of double helix forming circular oligonucleotides. *Nucl. Acids Res.* **25**, 4954-4961.

20

Castelli, J., Wood, K.A. & Youle, R.J. (1998). The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomed. Pharmacother.* **52**, 386-390.

25

Dolinnaya, N.G., Blumenfeld, M., Merenkova, I., Oretskaya, T.S., Krynetskaya, N.F., Ivanovskaya, M.G., Vasseur, M. & Shabarova, Z.A. (1993). Oligonucleotide circularization by template-directed chemical ligation. *Nucl. Acids Res.* **21**, 5403-5407.

30

Expert-Bezancon, A., Milet, M. & Carbon, P. (1983). Precise localization of several covalent RNA-RNA cross-link in *Escherichia coli* 16S RNA. *Eur. J. Biochem.* **136**, 267-274.

35

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. & Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.

40

Gao, H., Yang, M., Patel, R. & Cook, A.F. (1995). Circularization of oligonucleotides by disulfide bridge formation. *Nucl. Acids Res.* **23**, 2025-2029.

45

Gryaznov, S.M. & Letsinger, R.L. (1993). Template controlled coupling and recombination of oligonucleotide blocks containing thiophosphoryl groups. *Nucl. Acids Res.* **21**, 1403-1408.

50

Kaufman, R.J. (1999). Double-stranded RNA-activated protein kinase mediates virus-induced apoptosis: A new role for an old actor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 11693-11695.

55

Lipson, S.E. & Hearst, J.E. (1988). Psoralen cross-linking of ribosomal RNA. In *Methods in Enzymology* Anonymous pp. 330-341.

Liu, Z.R., Sargueil, B. & Smith, C.W. (1998). Detection of a novel ATP-dependent cross-linked protein at the 5' splice site-U1 small nuclear RNA duplex by methylene bluemediated photo-cross-linking. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6910-6920.

Micura, R. (1999). Cyclic oligoribonucleotides (RNA) by solidphase synthesis. *Chem. Eur. J.* **5**, 2077-2082.

Skripkin, E., Isel, C., Marquet, R., Ehresmann, B. & Ehresmann, C. (1996). Psoralen crosslinking between human immunodeficiency virus type 1 RNA and primer tRNA₃^{Lys}. *Nucl. Acids Res.* **24**, 509-514.

Wang, S. & Kool, E.T. (1994). Circular RNA oligonucleotides. Synthesis, nucleic acid binding properties, and a comparison with circular DNAs. *Nucl. Acids Res.* **22**, 2326-2333.

Wang, Z. & Rana, T.M. (1996). RNA conformation in the Tat-TAR complex determined by site-specific photo-cross-linking. *Biochem.* **35**, 6491-6499.

Watkins, K.P. & Agabian, N. (1991). *In vivo* UV cross-linking of U snRNAs that participate in trypanosome trans-splicing. *Genes & Development* **5**, 1859-1869.

EP 1 144 623 B1

Wengel, J. (1999). Synthesis of 3'-C- and 4'-C-branched oligodeoxynucleotides and the development of locked nucleic acid (LNA). *Acc. Chem. Res.* 32, 301-310.

5 Zwieb, C., Ross, A., Rinke, J., Meinke, M. & Brimacombe, R. (1978). Evidence for RNA-RNA cross-link formation in *Escherichia coli* ribosomes. *Nucl. Acids Res.* 5, 2705-2720.

SEQUENZ PROTOKOLL

[0052]

10

<110> Kreutzer Dr., Roland
Limmer Dr., Stephan
<120> Verfahren und Medikament zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Gens
<130> 400968

15

<140>
<141>
<150> 199 03 713.2
<151> 1999-01-30
<150> 199 56 568.6

20

<151> 1999-11-24
<160> 8
<170> Patentin Ver. 2.1
<210> 1

25

<211> 45
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: EcoRI-Schnittstelle, T7-RNA-Polymerasepromotor
<400> 1

30

ggaattctaa tagactcac tatagggcga tcagatctct agaag 45

35

<210> 2
<211> 50
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
40 BamHI-Schnittstelle, SP6-RNA-Polymerasepromotor
<400> 2

45

gggatccatt taggtgacac tatagaatac ccatgatcgc gtagtcgata 50

50

<210> 3
<211> 340
<212> RNA
50 <213> Künstliche Sequenz
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: RNA, die einer Sequenz aus der "positive control DNA" des HeLaS-
cribe Nuclear Extract in vitro Transkriptionskits der Firma Promega entspricht
<400> 3

55

EP 1 144 623 B1

```

ucagaucucu agaagcuua augcgguagu uuaucacagu uaaauugcua acgcagucag 60
gcaccgugua ugaaaucuaa caaugcgucuc aucgucaucc ucggcacccgu caccucggau 120
5 gcuguaggca uaggcuuggu uaugccgguà cùgccgggcc ucuugcggga uaucguccau 180
uccgacagca ucgccaguca cuauggcgug cugcuagcgc uauaugcguu gaugcaauuu 240
cuaugcgcac ccguucucgg agcacugucc gaccgcuuug gccgccgccc aguccugcuc 300
gcuucgcuaç uuggagccac uaucgacuac gcgaucaugg 340

```

<210> 4

<211> 363

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: DNA, die einer Sequenz aus der "positive control DNA" des HeLaS-
cribe Nuclear Extract in vitro Transkriptionskits der Firma Promega entspricht

<400> 4

```

tcagatctct agaagcttta atgcggtagt ttatcacagt taaattgcta acgcagtcag 60

```

```

25 gcaccgtgta tgaaatctaa caatgcgctc atcgatcatc tcggcacccgt caccctggat 120
gctgtaggca taggcttggc tatgccggta ctgccgggcc tcttgccgga tatcgtccat 180
tcgacagca tcgccagtca ctatggcgtg ctgctagcgc tatatgcgtt gatgcaattt 240
30 ctatgcgcac ccgttctcgg agcactgtcc gaccgctttg gccgccgccc agtcctgtgc 300
gcttcgctac ttggagccac tategactac gcgatcatgg cgaccacacc cgtcctgtgg 360
atc 363

```

<210> 5

<211> 315

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sequenz aus dem YFP-Gen

<400> 5

```

45 auggugagca agggcgagga gcuñuacac gggguggugc ccauccuggu cgagcuggac 60
ggcgacguaa acggccacaa guucagcgug uccggcgagg gcgagggcga ugccaccuac 120
ggcaagtuga ccgugaagu caucugcac accggcaagc ugcccuggcc cuggcccacc 180
cucgugacca ccugaccua cggcgugcag ugcuuacgcc gcuaccccga ccaçaugaag 240
cagtcacgacu ucuuacaguc cgccaugccc gaaggcuacg uccaggagcg caccaucuuc 300
50 uucaaggacg acggc 315

```

<210> 6

<211> 52

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: EcoRI-Schnittstelle, T7-RNA-Polymerasepromotor, komplementärer Bereich zum YFP-Gen

EP 1 144 623 B1

<400> 6

ggaattctaa tacgactcac tatagggcga atggtgagca agggcgagga gc 52

5

<210> 7

<211> 53

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

10

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: BamHI-Schnittstelle, SP6-RNA-Polymerasepromotor, komplementärer Bereich zum YFP-Gen

<400> 7

15

gggatccatt taggtgacac tatagaatc gccgtcgtcc ttgaagaaga tgg 53

<210> 8

<211> 21

20

<212> RNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: RNA, die einer Sequenz aus dem YFP-Gen entspricht

<400> 8

25

ucgagcugga cggcgacgua a 21

30

Patentansprüche

1. Verfahren zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens in einer Zelle in vitro, wobei ein Oligoribonukleotid von aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen gebildeter doppelsträngiger Struktur (dsRNA) in die Zelle eingeführt wird, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß der komplementäre Bereich weniger als 25 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die dsRNA in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, eingeschlossen wird.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen wird.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimiert wird.
5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.
6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimiert wird.
7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

EP 1 144 623 B1

9. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 5 11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Enden der dsRNA modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
- 10 12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.
- 15 13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.
14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden der doppelsträngigen Struktur hergestellt wird.
- 20 15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet wird, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propandiol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.
- 25 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet wird.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in die doppelsträngige Struktur eingeführte Azabenzoleinheiten gebildet wird.
- 30 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Nukleotiden benutzten verzweigten Nukleotidanaloga gebildet wird.
- 35 19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird. Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N⁶-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden der doppelsträngigen Struktur angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet wird.
- 40 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden der doppelsträngigen Struktur durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt wird.
- 45 22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA in der doppelsträngigen Struktur durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt ist.
- 50 23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang der doppelsträngigen Struktur ein "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring ist.
24. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben wird.
- 55 25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
26. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.

EP 1 144 623 B1

27. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 5 28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Strang der dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
- 10 30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs in die Zelle eingeführt werden, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens zwei verschiedenen Zielgenen ist.
- 15 31. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eines der Zielgene das PKR-Gen ist.
32. Medikament mit mindestens einem Oligoribonukleotid von doppelsträngiger aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen gebildeter Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist,
dadurch gekennzeichnet, daß
20 der komplementäre Bereich weniger als 25 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
33. Medikament nach Anspruch 32, wobei die dsRNA verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.
- 25 34. Medikament nach einem der Ansprüche 32 oder 33, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
- 30 35. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 34, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
36. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 35, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Priongen.
- 35 37. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 36, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.
38. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 37, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
- 40 39. Medikament nach Anspruch 38, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
40. Medikament nach Anspruch 38, wobei das Virus oder Viroid ein tierpathogenes Virus oder Viroid ist.
41. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 40, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 45 42. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 40, wobei die Enden der dsRNA modifiziert werden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
- 50 43. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 42, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.
44. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 43, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.
- 55 45. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 44, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden der doppelsträngigen Struktur hergestellt wird.

EP 1 144 623 B1

46. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 45, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propanediol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.
- 5 47. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 46, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloge gebildet ist.
48. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 47, wobei die chemische Verknüpfung durch in die doppelsträngige Struktur eingeschaltete Azabenzoleinheiten gebildet ist.
- 10 49. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 48, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Nukleotiden benutzten verzweigten Nukleotidanaloge gebildet ist.
- 15 50. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 49, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N-(pglyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
51. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 50, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden der doppelsträngigen Struktur vorgesehene Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.
- 20 52. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 51, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden der doppelsträngigen Struktur vorgesehene Tripelhelix-Bindungen sind.
- 25 53. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 52, wobei mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA in der doppelsträngigen Struktur durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt ist.
- 30 54. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 53, wobei mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang der doppelsträngigen Struktur ein "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring ist.
- 35 55. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 54, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.
56. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 55, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
57. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 56, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
- 40 58. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 57, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
59. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 58, wobei ein Strang der dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
- 45 60. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 59, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
- 50 61. Medikament nach einem der Ansprüche 32 bis 60, wobei darin mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs enthalten sind, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens zwei verschiedenen Zielgenen ist.
- 55 62. Medikament nach Anspruch 61, wobei eines der Zielgene das PKR-Gen ist.
63. Wirkstoff mit mindestens einem Oligoribonukleotid von doppelsträngiger aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen gebildeter Struktur (dsRNA) zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, und wobei das Zielgen Bestandteil eines pflanzen-

EP 1 144 623 B1

pathogenen Virus oder Viroids ist,
dadurch gekennzeichnet, daß
der komplementäre Bereich weniger als 25 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.

- 5 64. Wirkstoff nach Anspruch 63, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
65. Wirkstoff nach Anspruch 63 oder 64, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 10 66. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 65, wobei die Enden der dsRNA modifiziert worden, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
67. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 66, wobei der durch die komplementären Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht wird.
- 15 68. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 67, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet wird.
- 20 69. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 69, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden der doppelsträngigen Struktur hergestellt wird.
70. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 69, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propanediol)-und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.
- 25 71. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 70, wobei, die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet ist.
- 30 72. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 71, wobei die chemische Verknüpfung durch in die doppelsträngige Struktur eingeschaltete Azabenzoleinheiten gebildet ist.
73. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 72, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Nukleotiden benutzten verzweigten Nukleotidanaloga gebildet ist.
- 35 74. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 73, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis-(2-chlorethyl)-amin; N-acetyl-N'-(glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
- 40 75. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 74, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden der doppelsträngigen Struktur vorgesehene Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.
76. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 75, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden der doppelsträngigen Struktur vorgesehene Tripelhelix-Bindungen sind.
- 45 77. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 76, wobei mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA in der doppelsträngigen Struktur durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt ist.
- 50 78. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 77, wobei mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang der doppelsträngigen Struktur ein "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring ist.
- 55 79. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 78, wobei ein Strang der dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
80. Wirkstoff nach einem der Ansprüche 63 bis 79, wobei darin mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs enthalten sind, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von

EP 1 144 623 B1

mindestens zwei verschiedenen Zielgenen ist.

- 5 81. Verwendung eines Oligoribonukleotids von doppelsträngiger aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen gebildeter Struktur-(dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments oder Wirkstoffs zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, **dadurch gekennzeichnet, daß** der komplementäre Bereich weniger als 25 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
- 10 82. Verwendung nach Anspruch 81, wobei die dsRNA verpackt in micellare Strukturen, vorzugsweise in Liposomen, vorliegt.
- 15 83. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 oder 82, wobei die dsRNA in virale natürliche Kapside oder in auf chemischem oder enzymatischem Weg hergestellte künstliche Kapside oder davon abgeleitete Strukturen eingeschlossen ist.
- 20 84. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 83, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
85. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 84, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen, Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.
- 25 86. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 85, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.
87. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 86, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.
88. Verwendung nach Anspruch 87, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.
89. Verwendung nach Anspruch 87, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.
- 30 90. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 89, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.
- 35 91. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 90, wobei die Enden der dsRNA modifiziert sind, um einem Abbau in der Zelle oder einer Dissoziation in die Einzelstränge entgegenzuwirken.
- 40 92. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 91, wobei der durch die Nukleotidpaare bewirkte Zusammenhalt der doppelsträngigen Struktur durch mindestens eine, vorzugsweise zwei, weitere chemische Verknüpfung/en erhöht ist.
- 45 93. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 92, wobei die chemische Verknüpfung durch eine kovalente oder ionische Bindung, eine Wasserstoffbrückenbindung, hydrophobe Wechselwirkungen, vorzugsweise van-der-Waals- oder Stapelungswechselwirkungen, oder durch Metall-Ionenkoordination gebildet ist.
- 50 94. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 93, wobei die chemische Verknüpfung an mindestens einem, vorzugsweise an beiden, Enden der doppelsträngigen Struktur hergestellt ist.
95. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 94, wobei die chemische Verknüpfung mittels einer oder mehrerer Verbindungsgruppen gebildet ist, wobei die Verbindungsgruppen vorzugsweise Poly-(oxyphosphinicoxy-1,3-propanediol)- und/oder Polyethylenglycol-Ketten sind.
- 55 96. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 95, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Purinen benutzten Purinanaloga gebildet ist.
97. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 96, wobei die chemische Verknüpfung durch in die doppelsträngigen Struktur eingeführte Azabenzoleinheiten gebildet ist.
98. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 97, wobei die chemische Verknüpfung durch in der doppelsträngigen Struktur anstelle von Nukleotiden benutzten verzweigten Nukleotidanaloga gebildet ist.

EP 1 144 623 B1

99. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 98, wobei zur Herstellung der chemischen Verknüpfung mindestens eine der folgenden Gruppen benutzt wird: Methylenblau; bifunktionelle Gruppen, vorzugsweise Bis- (2-chlorethyl) -amin; N-acetyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamin; 4-Thiouracil; Psoralen.
- 5 100. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 99, wobei die chemische Verknüpfung durch an den Enden der doppelsträngigen Struktur angebrachte Thiophosphoryl-Gruppen gebildet ist.
101. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 100, wobei die chemische Verknüpfung an den Enden der doppelsträngigen Struktur durch Tripelhelix-Bindungen hergestellt ist.
- 10 102. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 101, wobei mindestens eine 2'-Hydroxylgruppe der Nukleotide der dsRNA in der doppelsträngigen Struktur durch eine chemische Gruppe, vorzugsweise eine 2'-Amino- oder eine 2'-Methylgruppe, ersetzt ist.
- 15 103. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 102, wobei mindestens ein Nukleotid in mindestens einem Strang der doppelsträngigen Struktur ein "locked nucleotide" mit einem, vorzugsweise durch eine 2'-O, 4'-C-Methylenbrücke, chemisch modifizierten Zuckerring ist.
- 20 104. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 103, wobei die dsRNA an mindestens ein von einem Virus stammendes, davon abgeleitetes oder ein synthetisch hergestelltes virales Hüllprotein gebunden, damit assoziiert oder davon umgeben ist.
105. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 104, wobei das Hüllprotein vom Polyomavirus abgeleitet ist.
- 25 106. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 105, wobei das Hüllprotein das Virus-Protein 1 (VP1) und/oder das Virus-Protein 2 (VP2) des Polyomavirus enthält.
107. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 106, wobei bei Bildung eines Kapsids oder kapsidartigen Gebildes aus dem Hüllprotein die eine Seite zum Inneren des Kapsids oder kapsidartigen Gebildes gewandt ist.
- 30 108. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 107, wobei ein Strang der dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
- 35 109. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 108, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.
110. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 109, wobei mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs verwendet werden, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens zwei verschiedenen Zielgenen ist.
- 40 111. Verwendung nach Anspruch 110, wobei eines der Zielgene das PKR-Gen ist.
112. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 111, wobei das Medikament in die Blutbahn oder das Interstitium des zu therapierenden Organismus injizierbar ist.
- 45 113. Verwendung nach einem der Ansprüche 81 bis 112, wobei die dsRNA in Bakterien oder Mikroorganismen aufgenommen ist.
- 50 114. Verwendung eines Vektors zur Kodierung mindestens eines Oligoribonukleotids von doppelsträngiger aus zwei separaten RNA-Einzelsträngen gebildeter Struktur (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments oder Wirkstoffs zur Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens, wobei ein Strang der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist,
dadurch gekennzeichnet, daß
der komplementäre Bereich weniger als 25 aufeinanderfolgende Nukleotidpaare aufweist.
- 55 115. Verwendung nach Anspruch 114, wobei das Zielgen in eukaryontischen Zellen exprimierbar ist.
116. Verwendung nach Anspruch 114 oder 115, wobei das Zielgen aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Onkogen,

EP 1 144 623 B1

Cytokin-Gen, Id-Protein-Gen, Entwicklungsgen, Prionen.

117. Verwendung nach einem der Ansprüche 114 bis 116, wobei das Zielgen in pathogenen Organismen, vorzugsweise in Plasmodien, exprimierbar ist.

118. Verwendung nach einem der Ansprüche 114 bis 117, wobei das Zielgen Bestandteil eines Virus oder Viroids ist.

119. Verwendung nach Anspruch 118, wobei das Virus ein humanpathogenes Virus oder Viroid ist.

120. Verwendung nach Anspruch 118, wobei das Virus oder Viroid ein tier- oder pflanzenpathogenes Virus oder Viroid ist.

121. Verwendung nach einem der Ansprüche 114 bis 120, wobei die dsRNA abschnittsweise doppelsträngig ausgebildet ist.

122. Verwendung nach einem der Ansprüche 114 bis 121, wobei ein Strang der dsRNA zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.

123. Verwendung nach einem der Ansprüche 114 bis 122, wobei die Zelle eine Vertebratenzelle oder eine menschliche Zelle ist.

124. Verwendung nach einem der Ansprüche 114 bis 123, wobei mindestens zwei voneinander verschiedene dsRNAs verwendet werden, wobei ein Strang jeder dsRNA zumindest abschnittsweise komplementär zu jeweils einem von mindestens zwei verschiedenen Zielgenen ist.

125. Verwendung nach Anspruch 124, wobei eines der Zielgene das PKR-Gen ist.

Claims

1. Method for inhibiting the expression of a given target gene in a cell in vitro, where an oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) formed by two separate RNA single strands is introduced into the cell, where one strand of the dsRNA has a region which is complementary to the target gene, characterized in that the complementary region has less than 25 successive nucleotide pairs.

2. Method according to claim 1, where the dsRNA is enclosed by micellar structures, preferably by liposomes.

3. Method according to either of the preceding claims, where the dsRNA is enclosed by natural viral capsids or by chemically or enzymatically produced artificial capsids or structures derived therefrom.

4. Method according to one of the preceding claims, where the target gene is expressed in eukaryotic cells.

5. Method according to one of the preceding claims, where the target gene is selected from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.

6. Method according to one of the preceding claims, where the target gene is expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.

7. Method according to one of the preceding claims, where the target gene is part of a virus or viroid.

8. Method according to claim 7, where the virus is a virus or viroid which is pathogenic for humans.

9. Method according to claim 7, where the virus or viroid is a virus or viroid which is pathogenic for animals or phytopathogenic.

10. Method according to one of the preceding claims, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.

EP 1 144 623 B1

11. Method according to one of the preceding claims, where the ends of the dsRNA are modified in order to counteract degradation in the cell or dissociation into the single strands.
- 5 12. Method according to one of the preceding claims, where the cohesion of the double-stranded structure, which is caused by the complementary nucleotide pairs, is increased by at least one, preferably two, further chemical linkage (s).
- 10 13. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
14. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is generated at at least one, preferably both, ends of the double-stranded structure.
- 15 15. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by means of one or more compound groups, the compound groups preferably being poly(oxyphosphinicoxy-1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol chains.
- 20 16. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by purine analogs used in the double-stranded structure in place of purines.
17. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by azabenzene units introduced into the double-stranded structure.
- 25 18. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by branched nucleotide analogs used in the double-stranded structure in place of nucleotides.
- 30 19. Method according to one of the preceding claims, where at least one of the following groups is used for generating the chemical linkage: methylene blue; bifunctional groups, preferably bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-gly-oxybenzoyl)cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
20. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage is formed by thiophosphoryl groups provided at the ends of the double-stranded structure.
- 35 21. Method according to one of the preceding claims, where the chemical linkage at the ends of the double-stranded structure is formed by triple-helix bonds.
- 40 22. Method according to one of the preceding claims, where at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the double-stranded structure is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
23. Method according to one of the preceding claims, where at least one nucleotide in at least one strand of the double-stranded structure is a locked nucleotide with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-methylene bridge.
- 45 24. Method according to one of the preceding claims, where the dsRNA is bound to, associated with or surrounded by, at least one viral coat protein which originates from a virus, is derived therefrom or has been prepared synthetically.
- 50 25. Method according to one of the preceding claims, where the coat protein is derived from polyomavirus.
26. Method according to one of the preceding claims, where the coat protein contains the polyomavirus virus protein 1 (VP1) and/or virus protein 2 (VP2).
- 55 27. Method according to one of the preceding claims, where, when a capsid or capsid-type structure is formed from the coat protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-type structure.
28. Method according to one of the preceding claims, where one strand of the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.

EP 1 144 623 B1

29. Method according to one of the preceding claims, where the cell is a vertebrate cell or a human cell.
30. Method according to one of the preceding claims, where at least two dsRNAs which differ from each other are introduced into the cell, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.
31. Method according to one of the preceding claims, where one of the target genes is the PKR gene.
32. Medicament with at least one oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) formed by two separate RNA single strands for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region which is complementary to the target gene, characterized in that the complementary region has less than 25 successive nucleotide pairs.
33. Medicament according to claim 32, where the dsRNA is enclosed by micellar structures, preferably by liposomes.
34. Medicament according to either of claims 32 or 33, where the dsRNA is enclosed by natural viral capsids or by chemically or enzymatically produced artificial capsids or structures derived therefrom.
35. Medicament according to one of claims 32 to 34, where the target gene can be expressed in eukaryotic cells.
36. Medicament according to one of claims 32 to 35, where the target gene is selected from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.
37. Medicament according to one of claims 32 to 36, where the target gene can be expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
38. Medicament according to one of claims 32 to 37, where the target gene is part of a virus or viroid.
39. Medicament according to claim 38, where the virus is a virus or viroid which is pathogenic for humans.
40. Medicament according to claim 38, where the virus or viroid is a virus or viroid which is pathogenic for animals.
41. Medicament according to one of claims 32 to 40, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.
42. Medicament according to one of claims 32 to 40, where the ends of the dsRNA are modified in order to counteract degradation in the cell or dissociation into the single strands.
43. Medicament according to one of claims 32 to 42, where the cohesion of the double-stranded structure, which is caused by the complementary nucleotide pairs, is increased by at least one, preferably two, further chemical linkage (s).
44. Medicament according to one of claims 32 to 43, where the chemical linkage is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
45. Medicament according to one of claims 32 to 44, where the chemical linkage is generated at at least one, preferably both, ends of the double-stranded structure.
46. Medicament according to one of claims 32 to 45, where the chemical linkage is formed by means of one or more compound groups, the compound groups preferably being poly(oxyphosphinicooxy-1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol chains.
47. Medicament according to one of claims 32 to 46, where the chemical linkage is formed by purine analogs used in the double-stranded structure in place of purines.
48. Medicament according to one of claims 32 to 47, where the chemical linkage is formed by azabenzene units inserted into the double-stranded structure.

EP 1 144 623 B1

49. Medicament according to one of claims 32 to 48, where the chemical linkage is formed by branched nucleotide analogs used in the double-stranded structure in place of nucleotides.
- 5 50. Medicament according to one of claims 32 to 49, where at least one of the following groups is used for generating the chemical linkage: methylene blue; bifunctional groups, preferably bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-gly-oxy/benzoyl) - cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
- 10 51. Medicament according to one of claims 32 to 50, where the chemical linkage is formed by thiophosphoryl groups provided at the ends of the double-stranded structure.
52. Medicament according to one of claims 32 to 51, where the chemical linkage are [sic] triple-helix bonds provided at the ends of the double-stranded structure.
- 15 53. Medicament according to one of claims 32 to 52, where at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the double-stranded structure is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
54. Medicament according to one of claims 32 to 53, where at least one nucleotide in at least one strand of the double-stranded structure is a locked nucleotide with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-methylene bridge.
- 20 55. Medicament according to one of claims 32 to 54, where the dsRNA is bound to, associated with or surrounded by, at least one viral coat protein which originates from a virus, is derived therefrom or has been prepared synthetically.
- 25 56. Medicament according to one of claims 32 to 55, where the coat protein is derived from the polyomavirus.
57. Medicament according to one of claims 32 to 56, where the coat protein contains the polyomavirus virus protein 1 (VP1) and/or virus protein 2 (VP2).
- 30 58. Medicament according to one of claims 32 to 57, where, when a capsid or capsid-type structure is formed from the coat protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-type structure.
59. Medicament according to one of claims 32 to 58, where one strand of the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
- 35 60. Medicament according to one of claims 32 to 59, where the cell is a vertebrate cell or a human cell.
61. Medicament according to one of claims 32 to 60, where at least two dsRNAs which differ from each other are contained in the medicament, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.
- 40 62. Medicament according to claim 61, where one of the target genes is the PKR gene.
63. Active ingredient with at least one oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) formed by two separate RNA single strands for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region which is complementary to the target gene, and where the target gene is part of a phytopathogenic virus or viroid,
characterized in that
the complementary region has less than 25 successive nucleotide pairs.
- 45 64. Active ingredient according to claim 63, where the target gene can be expressed in eukaryotic cells.
65. Active ingredient according to claim 63 or 64, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.
66. Active ingredient according to one of claims 63 to 65, where the ends of the dsRNA are modified in order to counteract degradation in the cell or dissociation into the single strands.
- 55 67. Active ingredient according to one of claims 63 to 66, where the cohesion of the double-stranded structure, which is caused by the complementary nucleotide pairs, is increased by at least one, preferably two, further chemical

linkage(s).

- 5 68. Active ingredient according to one of claims 63 to 67, where the chemical linkage is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
69. Active ingredient according to one of claims 63 to 68, where the chemical linkage is generated at at least one, preferably both, ends of the double-stranded structure.
- 10 70. Active ingredient according to one of claims 63 to 69, where the chemical linkage is formed by means of one or more compound groups, the compound groups preferably being poly(oxyphosphinicoxy-1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol chains.
71. Active ingredient according to one of claims 63 to 70, where the chemical linkage is formed by purine analogs used in the double-stranded structure in place of purines.
- 15 72. Active ingredient according to one of claims 63 to 71, where the chemical linkage is formed by azabenzene units inserted into the double-stranded structure.
- 20 73. Active ingredient according to one of claims 63 to 72, where the chemical linkage is formed by branched nucleotide analogs used in the double-stranded structure in place of nucleotides.
74. Active ingredient according to one of claims 63 to 73, where at least one of the following groups is used for generating the chemical linkage: methylene blue; bifunctional groups, preferably bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxy(benzoyl)cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
- 25 75. Active ingredient according to one of claims 63 to 74, where the chemical linkage is formed by thiophosphoryl groups provided at the ends of the double-stranded structure.
- 30 76. Active ingredient according to one of claims 63 to 75, where the chemical linkage are triple-helix bonds provided at the ends of the double-stranded structure.
77. Active ingredient according to one of claims 63 to 76, where at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the double-stranded structure is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
- 35 78. Active ingredient according to one of claims 63 to 77, where at least one nucleotides at least one strand of the double-stranded structure is a locked nucleotide with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-methylene bridge.
- 40 79. Active ingredient according to one of claims 63 to 78, where one strand of the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
80. Active ingredient according to one of claims 63 to 79, where at least two dsRNAs which differ from each other are contained in the active ingredient, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.
- 45 81. Use of an oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsRNA) formed by two separate RNA single strands for preparing a medicament or active ingredient for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region which is complementary to the target gene, characterized in that the complementary region has less than 25 successive nucleotide pairs.
- 50 82. Use according to claim 81, where the dsRNA is enclosed by micellar structures, preferably by liposomes.
- 55 83. Use according to either of claims 81 or 82, where the dsRNA is enclosed by natural viral capsids or by chemically or enzymatically produced artificial capsids or structures derived therefrom.

EP 1 144 623 B1

84. Use according to one of claims 81 to 83, where the target gene can be expressed in eukaryotic cells.
85. Use according to one of claims 81 to 84, where the target gene is selected from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.
86. Use according to one of claims 81 to 85, where the target gene can be expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.
87. Use according to one of claims 81 to 86, where the target gene is part of a virus or viroid.
88. Use according to claim 87, where the virus is a virus or viroid which is pathogenic for humans.
89. Use according to claim 87, where the virus or viroid is a virus or viroid which is pathogenic for animals or phytopathogenic.
90. Use according to one of claims 81 to 89, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.
91. Use according to one of claims 81 to 90, where the ends of the dsRNA are modified in order to counteract degradation in the cell or dissociation into the single strands.
92. Use according to one of claims 81 to 91, where the cohesion of the double-stranded structure, which is caused by the complementary nucleotide pairs, is increased by at least one, preferably two, further chemical linkage(s).
93. Use according to one of claims 81 to 92, where the chemical linkage is formed by a covalent or ionic bond, a hydrogen bond, hydrophobic interactions, preferably van-der-Waals or stacking interactions, or by metal-ion coordination.
94. Use according to one of claims 81 to 93, where the chemical linkage is generated at at least one, preferably both, ends of the double-stranded structure.
95. Use according to one of claims 81 to 94, where the chemical linkage is formed by means of one or more compound groups, the compound groups preferably being poly(oxyphosphinicoxy-1,3-propanediol) and/or polyethylene glycol chains.
96. Use according to one of claims 81 to 95, where the chemical linkage is formed by purine analogs used in the double-stranded structure in place of purines.
97. Use according to one of claims 81 to 96, where the chemical linkage is formed by azabenzene units introduced into the double-stranded structure.
98. Use according to one of claims 81 to 97, where the chemical linkage is formed by branched nucleotide analogs used in the double-stranded structure in place of nucleotides.
99. Use according to one of claims 81 to 98, where at least one of the following groups is used for generating the chemical linkage: methylene blue; bifunctional groups, preferably bis(2-chloroethyl)amine; N-acetyl-N'-(p-glyoxybenzoyl)-cystamine; 4-thiouracil; psoralene.
100. Use according to one of claims 81 to 99, where the chemical linkage is formed by thiophosphoryl groups attached to the ends of the double-stranded structure.
101. Use according to one of claims 81 to 100, where the chemical linkage at the ends of the double-stranded structure is formed by triple-helix bonds.
102. Use according to one of claims 81 to 101, where at least one 2'-hydroxyl group of the nucleotides of the dsRNA in the double-stranded structure is replaced by a chemical group, preferably a 2'-amino or a 2'-methyl group.
103. Use according to one of claims 81 to 102, where at least one nucleotide in at least one strand of the double-stranded structure is a locked nucleotide with a sugar ring which is chemically modified, preferably by a 2'-O, 4'-C-

EP 1 144 623 B1

methylene bridge.

104. Use according to one of claims 81 to 103, where the dsRNA is bound to, associated with or surrounded by, at least one viral coat protein which originates from a virus, is derived therefrom or has been prepared synthetically.

105. Use according to one of claims 81 to 104, where the coat protein is derived from polyomavirus.

106. Use according to one of claims 81 to 105, where the coat protein contains the polyomavirus virus protein 1 (VP1) and/or virus protein 2 (VP2).

107. Use according to one of claims 81 to 106, where, when a capsid or capsid-type structure is formed from the coat protein, one side faces the interior of the capsid or capsid-type structure.

108. Use according to one of claims 81 to 107, where one strand of the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.

109. Use according to one of claims 81 to 108, where the cell is a vertebrate cell or a human cell.

110. Use according to one of claims 81 to 109, where at least two dsRNAs which differ from each other are used, where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.

111. Use according to claim 110, where one of the target genes is the PKR gene.

112. Use according to one of claims 81 to 111, where the medicament is injectable into the bloodstream or into the interstitium of the organism to undergo therapy.

113. Use according to one of claims 81 to 112, where the dsRNA is taken up into bacteria or microorganisms.

114. Use of a vector for coding at least one oligoribonucleotide with double-stranded structure (dsBNA) formed by two separate RNA single strands for preparing a medicament or active ingredient for inhibiting the expression of a given target gene, where one strand of the dsRNA has a region which is complementary to the target gene, characterized in that the complementary region has less than 25 successive nucleotide pairs.

115. Use according to claim 114, where the target gene can be expressed in eukaryotic cells.

116. Use according to claim 114 or 115, where the target gene is selected from the following group: oncogene, cytokin gene, Id-protein gene, development gene, prion gene.

117. Use according to one of claims 114 to 116, where the target gene can be expressed in pathogenic organisms, preferably in plasmodia.

118. Use according to one of claims 114 to 117, where the target gene is part of a virus or viroid.

119. Use according to claim 118, where the virus is a virus or viroid which is pathogenic for humans.

120. Use according to claim 118, where the virus or viroid is a virus or viroid which is pathogenic for animals or phytopathogenic.

121. Use according to one of claims 114 to 120, where segments of the dsRNA are in double-stranded form.

122. Use according to one of claims 114 to 121, where one strand of the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.

123. Use according to one of claims 114 to 122, where the cell is a vertebrate cell or a human cell.

124. Use according to one of claims 114 to 123, where at least two dsRNAs which differ from each other are used,

EP 1 144 623 B1

where at least segments of one strand of each dsRNA are complementary to in each case one of at least two different target genes.

125. Use according to claim 125, where one of the target genes is the PKR gene.

Revendications

1. Procédé d'inhibition de l'expression d'un gène cible donné dans une cellule in vitro, dans lequel un oligoribonucléotide d'une structure double brin (ARNdb) formée de deux ARN simple brin séparés est introduit dans la cellule, un brin de l'ARNdb présentant une région complémentaire du gène cible, **caractérisé en ce que** la région complémentaire présente moins de 25 paires de nucléotides successives.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel l'ARNdb est incorporé dans des structures micellaires, de préférence dans des liposomes.
3. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel l'ARNdb est incorporé dans des capsides naturelles virales ou dans des capsides artificielles, préparées par voie chimique ou enzymatique, ou dans des structures en dérivant.
4. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le gène cible est exprimé dans des cellules eucaryotes.
5. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le gène cible est sélectionné parmi le groupe suivant: oncogène, gène de cytokine, gène d'Id protéine, gène de développement, gène de prion.
6. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le gène cible est exprimé dans des organismes pathogènes, de préférence dans des plasmodies.
7. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel le gène cible est une composante d'un virus ou d'un viroïde.
8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le virus est un virus ou un viroïde pathogène humain.
9. Procédé selon la revendication 7, dans lequel le virus ou le viroïde est un virus ou un viroïde pathogène animal ou végétal.
10. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel l'ARNdb est réalisé en double brin sur certaines portions ou segments.
11. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel les extrémités de l'ARNdb sont modifiées pour contrer une dégradation dans la cellule ou une dissociation en simples brins.
12. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la cohésion de la structure double brin, occasionnée par les paires de nucléotides complémentaires, est renforcée par au moins une, de préférence deux, autre(s) liaison(s) chimique(s).
13. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la liaison chimique est formée par une liaison covalente ou ionique, une liaison par pontage d'hydrogène, des interactions hydrophobes, de préférence des interactions Van der Waals ou d'empilement, ou par une coordination ionique métallique.
14. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la liaison chimique est réalisée au niveau d'au moins une, de préférence au niveau des deux extrémités de la structure double brin.
15. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la liaison chimique est formée au moyen d'un ou de plusieurs groupes de liaison, les groupes de liaison étant de préférence des chaînes poly-(oxyphosphinico-oxy-1,3-propanediol)- et/ou polyéthylèneglycol.

EP 1 144 623 B1

16. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la liaison chimique est formée par des analogues de purine utilisés à la place de la purine dans la structure double brin.
17. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la liaison chimique est formée par des motifs azabenzène introduits dans la structure double brin.
18. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la liaison chimique est formée par des analogues nucléotidiques ramifiés utilisés à la place de nucléotides dans la structure double brin.
19. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel on utilise au moins un des groupes suivants pour former la liaison chimique : bleu de méthylène ; groupes bifonctionnels, de préférence une bis-(2-chloroéthyl) amine ; N-acétyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine ; 4-thiouracile ; psoralène.
20. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la liaison chimique est formée par des groupes thiophosphoryle appliqués au niveau des extrémités de la structure double brin.
21. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la liaison chimique est formée au niveau des extrémités de la structure double brin par des liaisons en triple hélice.
22. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel au moins un groupe 2'-hydroxyle des nucléotides de l'ARNdb est remplacé dans la structure double brin par un groupe chimique, de préférence un groupe 2'-amino- ou 2'-méthyle.
23. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel au moins un nucléotide d'au moins un brin de la structure double brin est un "nucléotide fermé" présentant un cycle sucre modifié chimiquement, de préférence par un pont 2'-O,4'-C-méthylène.
24. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel l'ARNdb est lié à, associé à ou entouré par au moins une protéine enveloppe virale provenant d'un virus, dérivée de celui-ci ou fabriquée par voie synthétique.
25. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la protéine enveloppe est dérivée d'un polyomavirus.
26. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la protéine enveloppe contient la protéine virale 1 (VP1) et/ou la protéine virale 2 (VP2) du polyomavirus.
27. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel, lors de la formation d'une capside ou d'une structure de type capside à partir de la protéine enveloppe, un côté est tourné vers l'intérieur de la capside ou de la structure de type capside.
28. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel un brin de l'ARNdb est complémentaire du transcript d'ARN primaire ou traité du gène cible.
29. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel la cellule est une cellule de vertébré ou une cellule humaine.
30. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel au moins deux ARNdb différents l'un de l'autre sont introduits dans la cellule, un brin de chaque ARNdb étant complémentaire au moins sur certaines portions ou segments de respectivement un d'au moins deux gènes cibles différents.
31. Procédé selon l'une des revendications précédentes, dans lequel un des gènes cible est le gène PKR.
32. Médicament comportant au moins un oligoribonucléotide d'une structure double brin (ARNdb) formée de deux ARN simple brin séparés, destiné à inhiber l'expression d'un gène cible donné, un brin de l'ARNdb présentant une région complémentaire du gène cible, caractérisé en ce que la région complémentaire présente moins de 25 paires de nucléotides successives.

EP 1 144 623 B1

33. Médicament selon la revendication 32, dans lequel l'ARNdb est empaqueté dans des structures micellaires, de préférence des liposomes.
- 5 34. Médicament selon l'une des revendications 32 ou 33, dans lequel l'ARNdb est incorporé dans des capsides naturelles virales ou dans des capsides artificielles, préparées par voie chimique ou enzymatique, ou dans des structures en dérivant.
- 10 35. Médicament selon l'une des revendications 32 à 34, dans lequel le gène cible peut être exprimé dans des cellules eucaryotes.
36. Médicament selon l'une des revendications 32 à 35, dans lequel le gène cible est sélectionné parmi le groupe suivant : oncogène, gène de cytokine, gène d'Id-protéine, gène de développement, gène de prion.
- 15 37. Médicament selon l'une des revendications 32 à 36, dans lequel le gène cible peut être exprimé dans des organismes pathogènes, de préférence dans des plasmodies.
38. Médicament selon l'une des revendications 32 à 37, dans lequel le gène cible est une composante d'un virus ou d'un viroïde.
- 20 39. Médicament selon la revendication 38, dans lequel le virus est un virus ou un viroïde pathogène humain.
40. Médicament selon la revendication 38, dans lequel le virus ou le viroïde est un virus ou un viroïde pathogène animal.
- 25 41. Médicament selon l'une des revendications 32 à 40, dans lequel l'ARNdb est réalisé en double brin sur certaines portions ou segments.
42. Médicament selon l'une des revendications 32 à 40, dans lequel les extrémités de l'ARNdb sont modifiées pour contrer une dégradation dans la cellule ou une dissociation en simples brins.
- 30 43. Médicament selon l'une des revendications 32 à 42, dans lequel la cohésion de la structure double brin, occasionnée par les paires de nucléotides complémentaires, est renforcée par au moins une, de préférence deux, autre(s) liaison(s) chimique(s).
- 35 44. Médicament selon l'une des revendications 32 à 43, dans lequel la liaison chimique est formée par une liaison covalente ou ionique, une liaison par pontage d'hydrogène, des interactions hydrophobes, de préférence des interactions Van der Waals ou d'empilement, ou par une coordination ionique métallique.
45. Médicament selon l'une des revendications 32 à 44, dans lequel la liaison chimique est réalisée au niveau d'au moins une, de préférence au niveau des deux, extrémités de la structure double brin.
- 40 46. Médicament selon l'une des revendications 32 à 45, dans lequel la liaison chimique est formée au moyen d'un ou de plusieurs groupes de liaison, les groupes de liaison étant de préférence des chaînes poly-(oxyphosphinico-oxy-1,3-propanediol)- et/ou polyéthylèneglycol.
- 45 47. Médicament selon l'une des revendications 32 à 46, dans lequel la liaison chimique est formée par des analogues de purine utilisés à la place de la purine dans la structure double brin.
48. Médicament selon l'une des revendications 32 à 47, dans lequel la liaison chimique est formée par des motifs azabenzène introduits dans la structure double brin.
- 50 49. Médicament selon l'une des revendications 32 à 48, dans lequel la liaison chimique est formée par des analogues nucléotidiques ramifiés utilisés à la place de nucléotides dans la structure double brin.
- 55 50. Médicament selon l'une des revendications 32 à 49, dans lequel on utilise au moins un des groupes suivants pour former la liaison chimique : bleu de méthylène ; groupes bifonctionnels, de préférence une bis-(2-chloroéthyl) amine ; N-acétyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine ; 4-thiouracile ; psoralène.
51. Médicament selon l'une des revendications 32 à 50, dans lequel la liaison chimique est formée par des groupes

EP 1 144 623 B1

thiophosphoryle prévus au niveau des extrémités de la structure double brin.

- 5 52. Médicament selon l'une des revendications 32 à 51, dans lequel la liaison chimique est constituée par des liaisons en triple hélice au niveau des extrémités de la structure double brin.
53. Médicament selon l'une des revendications 32 à 52, dans lequel au moins un groupe 2'-hydroxyle des nucléotides de l'ARNdb est remplacé dans la structure double brin par un groupe chimique, de préférence un groupe 2'-amino- ou 2'-méthyle.
- 10 54. Médicament selon l'une des revendications 32 à 53, dans lequel au moins un nucléotide d'au moins un brin de la structure double brin est un "nucléotide fermé" présentant un cycle sucre modifié chimiquement, de préférence par un pont 2'-O,4'-C-méthylène.
- 15 55. Médicament selon l'une des revendications 32 à 54, dans lequel l'ARNdb est lié à, associé à ou entouré par au moins une protéine enveloppe virale provenant d'un virus, dérivée de celui-ci ou fabriquée par voie synthétique.
56. Médicament selon l'une des revendications 32 à 55, dans lequel la protéine enveloppe est dérivée d'un polyomavirus.
- 20 57. Médicament selon l'une des revendications 32 à 56, dans lequel la protéine enveloppe contient la protéine virale 1 (VP1) et/ou la protéine virale 2 (VP2) du polyomavirus.
58. Médicament selon l'une des revendications 32 à 57, dans lequel, lors de la formation d'une capside ou d'une structure de type capside à partir de la protéine enveloppe, un côté est tourné vers l'intérieur de la capside ou de la structure de type capside.
- 25 59. Médicament selon l'une des revendications 32 à 58, dans lequel un brin de l'ARNdb est complémentaire du transcript d'ARN primaire ou traité du gène cible.
- 30 60. Médicament selon l'une des revendications 32 à 59, dans lequel la cellule est une cellule de vertébré ou une cellule humaine.
61. Médicament selon l'une des revendications 32 à 60, dans lequel sont contenus au moins deux ARNdb différents l'un de l'autre, un brin de chaque ARNdb étant complémentaire au moins sur certaines portions ou segments de respectivement un d'au moins deux gènes cibles différents.
- 35 62. Médicament selon la revendication 61, dans lequel un des gènes cible est le gène PKR.
63. Principe actif comportant au moins un oligoribonucléotide d'une structure double brin (ARNdb) formée de deux ARN simple brin séparés, destiné à inhiber l'expression d'un gène cible donné, un brin de l'ARNdb présentant une région complémentaire du gène cible, et dans lequel le gène cible est une composante d'un virus ou d'un viroïde pathogène végétal, caractérisé en ce que la région complémentaire présente moins de 25 paires de nucléotides successives.
- 40 64. Principe actif selon la revendication 63, dans lequel le gène cible peut être exprimé dans des cellules eucaryotes.
65. Principe actif selon la revendication 63 ou 64, dans lequel l'ARNdb est réalisé en double brin sur certaines portions ou segments.
- 50 66. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 65, dans lequel les extrémités de l'ARNdb sont modifiées pour contrer une dégradation dans la cellule ou une dissociation en simples brins.
67. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 66, dans lequel la cohésion de la structure double brin, occasionnée par les paires de nucléotides complémentaires, est renforcée par au moins une, de préférence deux, autre(s) liaison(s) chimique(s).
- 55 68. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 67, dans lequel la liaison chimique est formée par une liaison

EP 1 144 623 B1

covalente ou ionique, une liaison par pontage d'hydrogène, des interactions hydrophobes, de préférence des interactions Van der Waals ou d'empilement, ou par une coordination ionique métallique.

- 5 69. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 68, dans lequel la liaison chimique est réalisée au niveau d'au moins une, de préférence au niveau des deux, extrémités de la structure double brin.
- 10 70. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 69, dans lequel la liaison chimique est formée au moyen d'un ou de plusieurs groupes de liaison, les groupes de liaison étant de préférence des chaînes poly-(oxyphosphinico-oxy-1,3-propanediol)- et/ou polyéthylèneglycol.
71. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 70, dans lequel la liaison chimique est formée par des analogues de purine utilisés à la place de la purine dans la structure double brin.
- 15 72. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 71, dans lequel la liaison chimique est formée par des motifs azabenzène introduits dans la structure double brin.
73. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 72, dans lequel la liaison chimique est formée par des analogues nucléotidiques ramifiés utilisés à la place de nucléotides dans la structure double brin.
- 20 74. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 73, dans lequel on utilise au moins un des groupes suivants pour former la liaison chimique : bleu de méthylène ; groupes bifonctionnels, de préférence une bis-(2-chloroéthyl) amine ; N-acétyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine ; 4-thiouracile ; psoralène.
- 25 75. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 74, dans lequel la liaison chimique est formée par des groupes thiophosphoryle prévus au niveau des extrémités de la structure double brin.
76. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 75, dans lequel la liaison chimique est constituée par des liaisons en triple hélice au niveau des extrémités de la structure double brin.
- 30 77. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 76, dans lequel au moins un groupe 2'-hydroxyle des nucléotides de l'ARNdb est remplacé dans la structure double brin par un groupe chimique, de préférence un groupe 2'-amino- ou 2'-méthyle.
- 35 78. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 77, dans lequel au moins un nucléotide d'au moins un brin de la structure double brin est un "nucléotide fermé" présentant un cycle sucre modifié chimiquement, de préférence par un pont 2'-O,4'-C-méthylène.
79. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 78, dans lequel un brin de l'ARNdb est complémentaire du transcript d'ARN primaire ou traité du gène cible.
- 40 80. Principe actif selon l'une des revendications 63 à 79, dans lequel sont contenus au moins deux ARNdb différents l'un de l'autre, un brin de chaque ARNdb étant complémentaire au moins sur certaines portions ou segments de respectivement un d'au moins deux gènes cibles différents.
- 45 81. Utilisation d'un oligoribonucléotide d'une structure double brin (ARNdb) formée de deux ARN simple brin séparés pour préparer un médicament ou un principe actif destiné à inhiber l'expression d'un gène cible donné, un brin de l'ARNdb présentant une région complémentaire du gène cible, **caractérisée en ce que**
la région complémentaire présente moins de 25 paires de nucléotides successives.
- 50 82. Utilisation selon la revendication 81, dans laquelle l'ARNdb est empaqueté dans des structures micellaires, de préférence des liposomes.
- 55 83. Utilisation selon l'une des revendications 81 ou 82, dans laquelle l'ARNdb est incorporé dans des capsides naturelles virales ou dans des capsides artificielles, préparées par voie chimique ou enzymatique, ou dans des structures en dérivant.
84. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 83, dans laquelle le gène cible peut être exprimé dans des cellules

EP 1 144 623 B1

eucaryotes.

- 5
85. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 84, dans laquelle le gène cible est sélectionné parmi le groupe suivant : oncogène, gène de cytokine, gène d'Id-protéine, gène de développement, gène de prion.
86. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 85, dans laquelle le gène cible peut être exprimé dans des organismes pathogènes, de préférence dans des plasmodies.
- 10
87. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 86, dans laquelle le gène cible est une composante d'un virus ou d'un viroïde.
88. Utilisation selon la revendication 87, dans laquelle le virus est un virus ou un viroïde pathogène humain.
- 15
89. Utilisation selon la revendication 87, dans laquelle le virus ou le viroïde est un virus ou un viroïde pathogène animal ou végétal.
90. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 89, dans laquelle l'ARNdb est réalisé à double brin sur certaines portions ou segments.
- 20
91. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 90, dans laquelle les extrémités de l'ARNdb sont modifiées pour contrer une dégradation dans la cellule ou une dissociation en simples brins.
- 25
92. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 91, dans laquelle la cohésion de la structure double brin, occasionnée par les paires de nucléotides complémentaires, est renforcée par au moins une, de préférence deux, autre(s) liaison(s) chimique(s).
- 30
93. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 92, dans laquelle la liaison chimique est formée par une liaison covalente ou ionique, une liaison par pontage d'hydrogène, des interactions hydrophobes, de préférence des interactions Van der Waals ou d'empilement, ou par une coordination ionique métallique.
- 35
94. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 93, dans laquelle la liaison chimique est réalisée au niveau d'au moins une, de préférence au niveau des deux, extrémités de la structure double brin.
95. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 94, dans laquelle la liaison chimique est formée au moyen d'un ou de plusieurs groupes de liaison, les groupes de liaison étant de préférence des chaînes poly-(oxyphosphinico-oxy-1,3-propanediol)- et/ou polyéthylèneglycol.
- 40
96. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 95, dans laquelle la liaison chimique est formée par des analogues de purine utilisés à la place de la purine dans la structure double brin.
- 45
97. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 96, dans laquelle la liaison chimique est formée par des motifs azabenzène introduits dans la structure double brin.
98. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 97, dans laquelle la liaison chimique est formée par des analogues nucléotidiques ramifiés utilisés à la place de nucléotides dans la structure double brin.
- 50
99. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 98, dans laquelle on utilise au moins un des groupes suivants pour former la liaison chimique : bleu de méthylène ; groupes bifonctionnels, de préférence une bis-(2-chloroéthyl) amine ; N-acétyl-N'-(p-glyoxyl-benzoyl)-cystamine ; 4-thiouracile ; psoralène.
- 55
100. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 99, dans laquelle la liaison chimique est formée par des groupes thiophosphoryle appliqués au niveau des extrémités de la structure double brin.
101. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 100, dans laquelle la liaison chimique est formée au niveau des extrémités de la structure double brin par des liaisons en triple hélice.
102. Utilisation selon l'une des revendications 81 à 101, dans laquelle au moins un groupe 2'-hydroxyle des nucléotides de l'ARNdb est remplacé dans la structure double brin par un groupe chimique, de préférence un groupe 2'-amino-

EP 1 144 623 B1

ou 2'-méthyle.

- 5 103.Utilisation selon l'une des revendications 81 à 102, dans laquelle au moins un nucléotide d'au moins un brin de la structure double brin est un "nucléotide fermé" présentant un cycle sucre modifié chimiquement, de préférence par un pont 2'-O,4'-C-méthylène.
- 10 104.Utilisation selon l'une des revendications 81 à 103, dans laquelle l'ARNdb est lié à, associé à ou entouré par au moins une protéine enveloppe virale provenant d'un virus, dérivée de celui-ci ou fabriquée par voie synthétique.
- 15 105.Utilisation selon l'une des revendications 81 à 104, dans laquelle la protéine enveloppe est dérivée d'un polyomavirus.
- 106.Utilisation selon l'une des revendications 81 à 105, dans laquelle la protéine enveloppe contient la protéine virale 1 (VP1) et/ou la protéine virale 2 (VP2) du polyomavirus.
- 20 107.Utilisation selon l'une des revendications 81 à 106, dans laquelle lors de la formation d'une capsid ou d'une structure de type capsid à partir de la protéine enveloppe, un côté est tourné vers l'intérieur de la capsid ou de la structure de type capsid.
- 25 108.Utilisation selon l'une des revendications 81 à 107, dans laquelle un brin de l'ARNdb est complémentaire du transcript d'ARN primaire ou traité du gène cible.
- 109.Utilisation selon l'une des revendications 81 à 108, dans laquelle la cellule est une cellule de vertébré ou une cellule humaine.
- 30 110.Utilisation selon l'une des revendications 81 à 109, dans laquelle au moins deux ARNdb différents l'un de l'autre sont utilisés, un brin de chaque ARNdb étant complémentaire au moins sur certaines portions ou segments de respectivement un d'au moins deux gènes cibles différents.
- 35 111.Utilisation selon la revendication 110, dans laquelle un des gènes cible est le gène PKR.
- 112.Utilisation selon l'une des revendications 81 à 111, dans laquelle le médicament peut être injecté dans le flux sanguin ou dans l'interstitium de l'organisme sur lequel est réalisée la thérapie.
- 40 113.Utilisation selon l'une des revendications 81 à 112, dans laquelle l'ARNdb est recueilli dans des bactéries ou des microorganismes.
- 114.Utilisation d'un vecteur de codage d'au moins un oligoribonucléotide d'une structure double brin (ARNdb) formée de deux ARN simple brin séparés pour fabriquer un médicament ou un principe actif destiné à inhiber l'expression d'un gène cible donné, un brin de l'ARNdb présentant une région complémentaire d'un gène cible, **caractérisée en ce que** la région complémentaire présente moins de 25 paires de nucléotides successives.
- 45 115.Utilisation selon la revendication 114, dans laquelle le gène cible peut être exprimé dans des cellules eucaryotes.
- 116.Utilisation selon la revendication 114 ou 115, dans laquelle le gène cible est sélectionné parmi le groupe suivant : oncogène, gène de cytokine, gène d'Id-protéine, gène de développement, gène de prion.
- 50 117.Utilisation selon l'une des revendications 114 à 116, dans laquelle le gène cible peut être exprimé dans des organismes pathogènes, de préférence dans des plasmodies.
- 118.Utilisation selon l'une des revendications 114 à 117, dans laquelle le gène cible est une composante d'un virus ou d'un viroïde.
- 55 119.Utilisation selon la revendication 118, dans laquelle le virus est un virus ou un viroïde pathogène humain.
- 120.Utilisation selon la revendication 118, dans laquelle le virus ou le viroïde est un virus ou un viroïde pathogène animal ou végétal.

EP 1 144 623 B1

121. Utilisation selon l'une des revendications 114 à 120, dans laquelle l'ARNdb est réalisé en double brin sur certaines portions ou segments.

122. Utilisation selon l'une des revendications 114 à 121, dans laquelle un brin de l'ARNdb est complémentaire du transcript d'ARN primaire ou traité du gène cible.

123. Utilisation selon l'une des revendications 114 à 122, dans laquelle la cellule est une cellule de vertébré ou une cellule humaine.

124. Utilisation selon l'une des revendications 114 à 123, dans laquelle au moins deux ARNdb différents l'un de l'autre sont utilisés, un brin de chaque ARNdb étant complémentaire au moins sur certaines portions ou segments de respectivement un d'au moins deux gènes cibles différents.

125. Utilisation selon la revendication 124, dans laquelle un des gènes cible est le gène PKR.

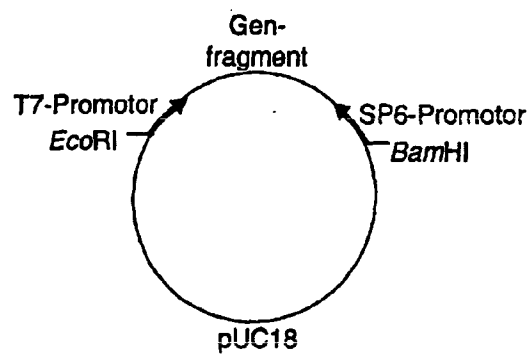


Fig. 1

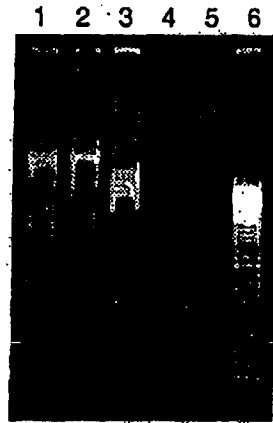


Fig. 2

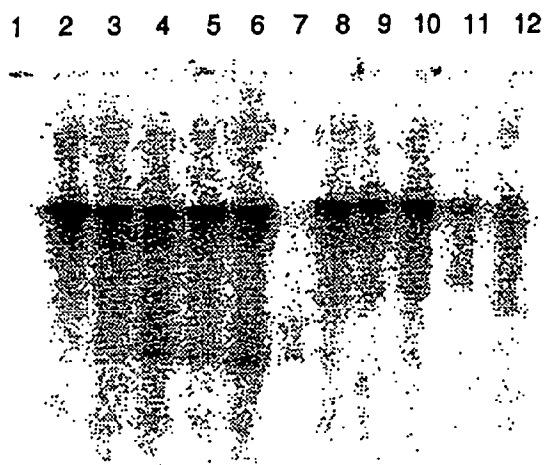


Fig. 3

Fig. 4 a

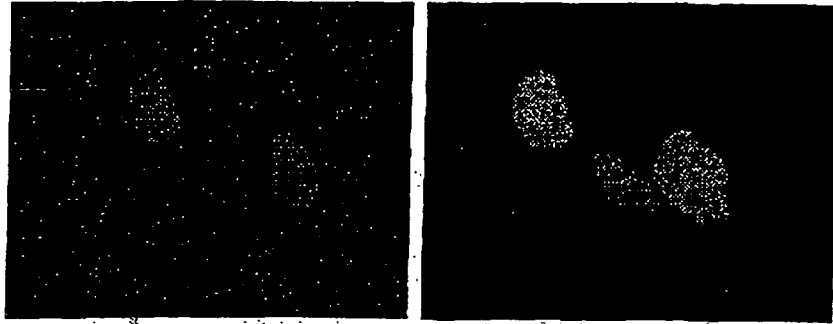


Fig. 4 b

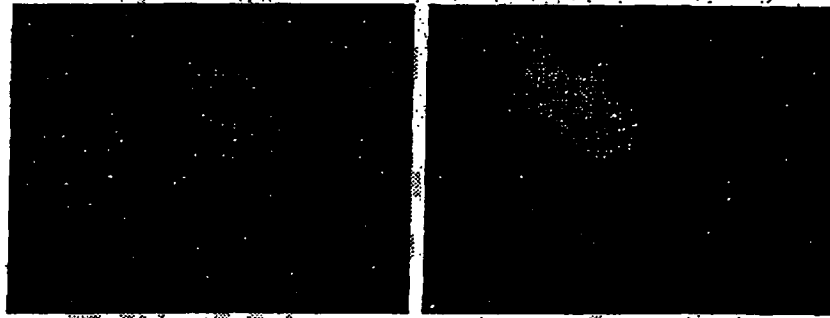


Fig. 4 c

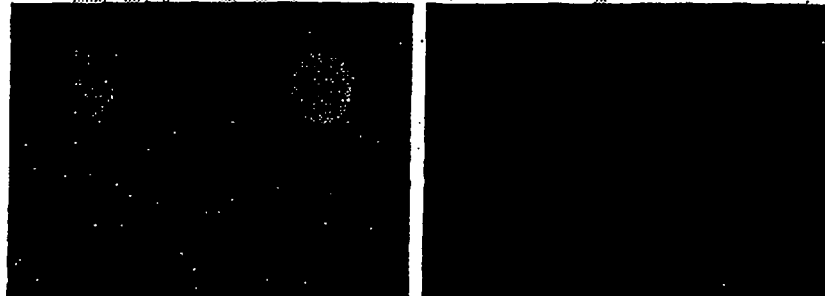


Fig. 4 d

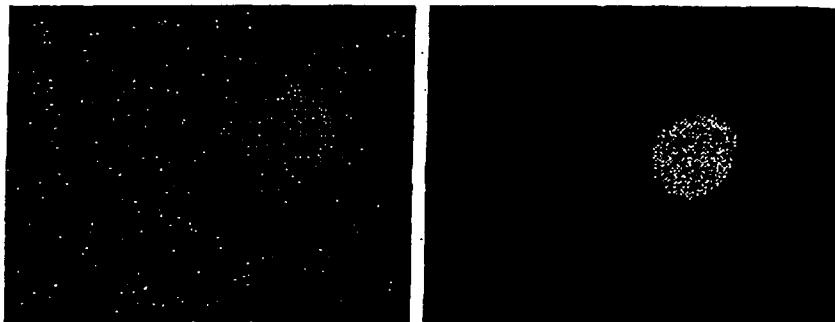


Fig. 4 e

